

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare

Dottorato di Ricerca in Patologia e Fisiopatologia Molecolare



***“Studio del meccanismo di oligomerizzazione di proteine
smistate alla superficie apicale in cellule epiteliali
polarizzate.”***

Coordinatore:

Prof. Vittorio Enrico Avvedimento

Candidato:

Dott.ssa Maria Agata Catino

Anno 2007

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

**“Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L.
Califano”**

Dottorato di Ricerca in Patologia e Fisiopatologia Molecolare

Coordinatore Prof. Vittorio Enrico Avvedimento

**Sede amministrativa:
Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “Luigi
Califano”**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

“FEDERICO II”

**“Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare “L.
Califano”**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in Patologia e Fisiopatologia
Molecolare
XX ciclo**

***“Studio del meccanismo di oligomerizzazione di proteine
smistate alla superficie apicale in cellule epiteliali
polarizzate.”***

Candidato: Dott.ssa Maria Agata Catino

Docente guida: Prof.ssa Chiara Zurzolo

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

MDCK : Madin – Darby Canine Kidney

HA : Emagglutinina del virus dell'influenza

VSVG: Proteina G del virus della stomatite vescicolare

TGN: Trans – Golgi Network

ER: Reticolo endoplasmatico

FRT: Fischer Rat Thyroid

GPI: Glicosil – fosfatidil – inositolo

ECM: Matrice extracellulare

PLAP: Placental alkaline phosphatase

P75^{NTR}: Neurotrophin receptor p75

AP: Adaptor protein

GPI-AP: Proteine GPI ancorate

DRM: Detergent resistant microdomain

GSL: glicosfingolipidi

DPPIV: dipeptidilpeptidasei IV

GFP: Green fluorescent protein

SNARE: Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor

VAMP: Vescicle associated membrane protein

EtNP: Fosfoetanolamina

PI: Fosfatidilinositolo

GlcNAc: N-acetilglucosammina

PNH: Emoglobinuria parossistica notturna

HMW: High molecular weight

PrP^c: forma cellulare della proteina prionica

MALDI: Matrix-assisted laser desorption ionization

FR: Folate receptor

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

PVDF : Polyvinylidene fluoride

ECL : Enhanced chemiluminescence

ES: Elettrospray

MS: Mass spectrometry

Hex: Esoso

INTRODUZIONE 10

1- LA POLARITÀ NELLE CELLULE EPITELIALI 10

Il tessuto epiteliale..... 10

La cellula epiteliale: un esempio di cellula polarizzata. 13

Cellule MDCK: un modello di cellule epiteliali polarizzate 16

2- MECCANISMI DI ACQUISIZIONE E DI MANTENIMENTO DELLA POLARITÀ CELLULARE..... 20

Segnali di smistamento:..... 22

1) segnali di smistamento basolaterali. 22

2) segnali di smistamento apicali. 25

L'ipotesi dei rafts come piattaforma di smistamento apicale. 27

Dal Golgi alla membrana plasmatica: smistamento diretto e indiretto (o transitosi). 32

Ruolo del citoscheletro e trasporto alla membrana plasmatica. 34

Fusione delle vescicole alla membrana..... 35

3- SMISTAMENTO DI PROTEINE AD ANCORA GPI. 37

Le proteine ad ancora GPI..... 37

Metodi analitici per l'analisi delle strutture di ancore GPI..... 43

Segregazione di proteine ad ancora GPI. 45

Trasporto delle proteine ad ancora GPI. 48

OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI 50

1- RUOLO DEI GLICANI NELL'OLIGOMERIZZAZIONE E NELLO SMISTAMENTO APICALE DI PROTEINE AD ANCORA GPI. 51

2- RUOLO DELL'ANCORA GPI NELL'OLIGOMERIZZAZIONE E NELLO SMISTAMENTO APICALE DI PROTEINE AD ANCORA GPI..... 53

La diversità strutturale dell'ancora GPI..... 53

3- IDENTIFICAZIONE DI FATTORI COINVOLTI NEL PROCESSO DI OLIGOMERIZZAZIONE E SMISTAMENTO APICALE DI PROTEINE AD ANCORA GPI 55

RISULTATI SPERIMENTALI	57
SOMMARIO:.....	58
RISULTATI SPERIMENTALI.....	60
1- ANALISI DELLA VIA DI TRASPORTO APICALE DELLE PROTEINE AD ANCORA GPI	60
<i>Problematica</i>	60
<i>Risultati</i>	62
<i>Conclusioni</i>	63
LAVORO N. 1:	65
“GPI-ANCHORED PROTEINS ARE DIRECTLY TARGETED TO THE APICAL SURFACE IN FULLY POLARIZED MDCK CELLS.”	65
2- RUOLO DELLA GLICOSILAZIONE NELLO SMISTAMENTO APICALE E NELL’OLIGOMERIZZAZIONE DI PROTEINE GPI ANCORATE.	66
<i>Problematica</i>	66
<i>Risultati</i>	67
<i>Conclusioni</i>	68
LAVORO N. 2:	70
“N- AND O- GLYCANS ARE NOT DIRECTLY INVOLVED IN THE OLIGOMERIZATION AND APICAL SORTING OF GPI ANCHORED PROTEINS.”	70
3- RUOLO DELL’ ANCORA GPI NELL’OLIGOMERIZZAZIONE E NELLO SMISTAMENTO APICALE DI PROTEINE AD ANCORA GPI.	71
<i>Problematica</i>	71
<i>Materiali e Metodi: Analisi della struttura dell’ancora GPI:</i>	75
1) preparazione del campione.	75
2) analisi degli zuccheri dell’ancora GPI.	76
3) analisi del fosfatidilinositolo dell’ancora GPI.	77
<i>Risultati :</i>	79
1) struttura dei glicani delle ancore GPI di PLAP e PrP purificate da cellule FRT e MDCK.....	79
2) struttura dei lipidi delle ancore GPI di PLAP e PrP purificate da cellule FRT e MDCK.	82

<i>Conclusioni</i>	84
4- IDENTIFICAZIONE DI PUTATIVI RECETTORI RESPONSABILI DELL' OLIGOMERIZZAZIONE E DELLO SMISTAMENTO APICALE DI PROTEINE AD ANCORA GPI.	87
<i>Problematica</i>	87
<i>Risultati preliminari</i>	88
<i>Conclusioni</i>	91
MATERIALI E METODI	94
<i>Reagenti ed anticorpi</i>	94
<i>Colture cellulari</i>	94
<i>Crescita di cellule su filtro</i>	95
<i>Costrutti e trasfezione</i>	96
<i>Immunofluorescenza</i>	97
<i>Saggio di biotinilazione</i>	97
<i>Immunoprecipitazione di lisati cellulari</i>	99
<i>Marcatura Metabolica (pulse-chase)</i>	99
<i>Gradiente di densità di saccarosio</i>	100
<i>Gradiente di velocità di sedimentazione</i>	101
<i>Permetilazione dei glicani dell' ancora GPI</i>	101
<i>Deamminazione dei lipidi dell' ancora GPI</i>	102
<i>Principio di utilizzo dello spettrometro di massa QSTAR XL</i>	102
DISCUSSIONE	108
1) <i>Studio del trasporto delle proteine GPI ancorate</i>	108
2) <i>Studio del meccanismo di smistamento apicale delle proteine GPI ancorate</i>	110
BIBLIOGRAFIA	116

INTRODUZIONE

INTRODUZIONE

1- La polarità nelle cellule epiteliali.

Il tessuto epiteliale.

Il tessuto epiteliale costituisce tipicamente il rivestimento delle superfici corporee. Esso è caratterizzato da cellule di forma molto regolare che aderiscono le une alle altre. Questo tipo di struttura rende il tessuto epiteliale una barriera tra l'ambiente corporeo e l'ambiente esterno. L'epitelio possiede, dunque, non solo la funzione di rivestire e delimitare le superfici, ma anche quella di filtro che media gli scambi tra l'esterno e l'interno dell'organismo e limita i possibili danni a questo da parte di agenti nocivi fisici, chimici e biologici. I tessuti epiteliali sono separati dai tessuti sottostanti mediante una membrana basale non cellulare, di natura fibrosa. Un tipo particolare di tessuto epiteliale è l'epidermide, o pelle; altri esempi sono i rivestimenti della bocca, della cavità nasale, dell'apparato respiratorio, dei canali dell'apparato riproduttore, dell'intestino e dei vasi sanguigni (Fig. 1).

In istologia, i tessuti epiteliali possono essere classificati in base al ruolo che svolgono all'interno del corpo. Possono essere così distinti l'epitelio di rivestimento, l'epitelio sensoriale e l'epitelio ghiandolare. L'epitelio di rivestimento ha, appunto, la funzione di rivestire le cavità esterne ed interne del corpo. Va a formare lo strato di protezione esterno chiamato cute, costituisce le tonache mucose e sierose localizzate nelle cavità interne del corpo, e ricopre inoltre i vasi sanguigni e i dotti escretori delle ghiandole. L'epitelio sensoriale è costituito da cellule disperse negli epiteli di rivestimento che hanno la funzione di ricevere e trasmettere determinati stimoli esterni alle cellule del tessuto nervoso. Ne sono un esempio le cellule che

costituiscono le papille gustative e le cellule acustiche dell'orecchio. L'epitelio ghiandolare (chiamato anche tessuto ghiandolare), infine, forma le ghiandole.

Morfologicamente, le cellule del tessuto epiteliale possono avere diverse forme in base alle quali è possibile distinguere gli epiteli in: pavimentosi (con cellule appiattite), cubici (con cellule aventi tutte lo stesso diametro), cilindrici o prismatici (con cellule a forma di colonna). Se le cellule epiteliali sono organizzate su un solo piano si parla di epitelio monostratificato o semplice, altrimenti si è in presenza di un epitelio pluristratificato (Fig. 2).

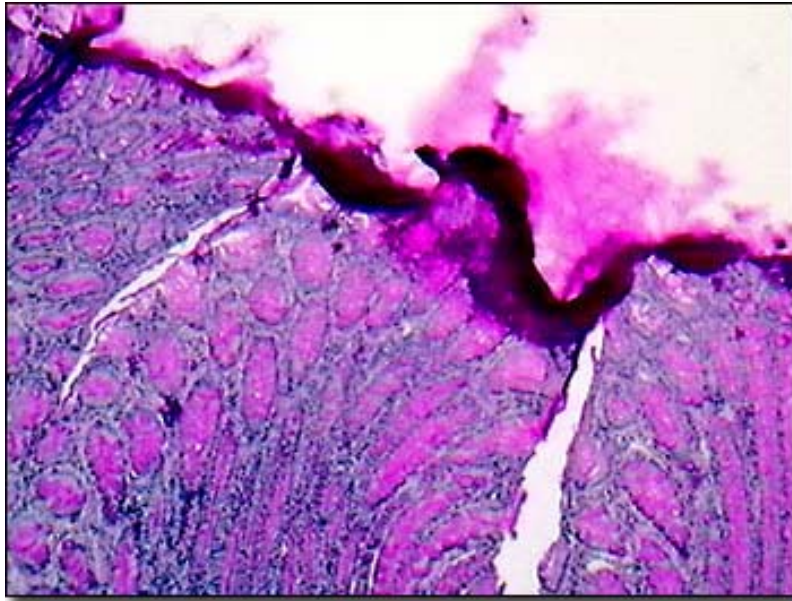


Fig.1 Tessuto epiteliale della mucosa del colon

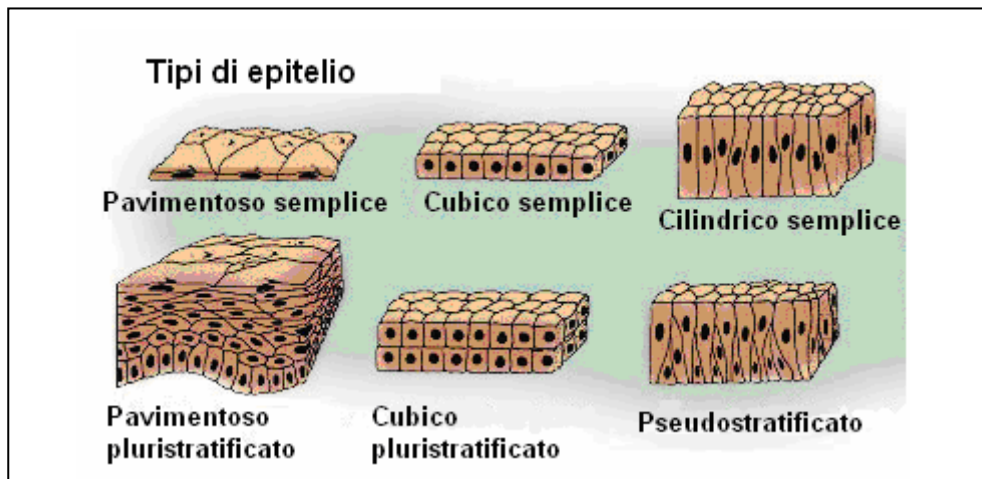


Fig. 2 I diversi tipi di epitelio

La cellula epiteliale: un esempio di cellula polarizzata.

Le cellule epiteliali presentano una forma geometrica ben definita e sono a stretto contatto fra loro, risultando scarsa o assente la sostanza intercellulare. Esse sono strettamente legate le une alle altre per mezzo di numerose giunzioni cellulari che rendono il tessuto compatto e resistente a traumi o strappi. Le cellule epiteliali devono creare una barriera protettiva e nello stesso tempo permettere scambi con l'ambiente esterno. Questo paradosso è stato risolto con la polarizzazione cellulare, cioè con lo sviluppo di due domini di membrana, funzionalmente e biochimicamente distinti: il dominio apicale e il dominio basolaterale.

Il dominio apicale della membrana plasmatica si affaccia verso il lume di organi interni ed è il dominio più specializzato in quanto contiene la maggioranza delle proteine necessarie alle funzioni specifiche dell'organo (digestione, assorbimento, riassorbimento). Sul dominio apicale possiamo distinguere varie strutture specifiche. I microvilli, ad esempio, sono delle estroflessioni della membrana plasmatica disposti in maniera regolare e rettilinea, aventi 0,1 micron di diametro e 1-2 micron di lunghezza. La struttura dei microvilli è mantenuta dal citoscheletro, costituito da una trentina di microfilamenti di actina ordinati parallelamente e tenuti insieme da ponti di villina e fimbrina. La zona apicale del fascio di microfilamenti (terminazione positiva) è stabilizzata da un cappuccio proteico ed è collegata lateralmente alla membrana attraverso la calmodulina e la miosina I. Alla base del microvillo, i microfilamenti sono invece ancorati ad una zona corticale, ricca in actina e spectrina. I microvilli hanno la funzione di aumentare la superficie di scambio, infatti si trovano soprattutto in cellule impiegate nell'assorbimento di acqua e nutrienti, come gli enterociti nell'intestino e le cellule che rivestono il lume del tubulo contorto prossimale nel rene.

Le ciglia vibratili sono presenti a livello dell'epitelio respiratorio, sulla superficie della

mucosa. Con i loro movimenti la ciglia vibratili propulsano le secrezioni mucose ad una velocità di 1 cm/ora circa. Le stereociglia, infine, sono lunghe propaggini di forma cilindrica contenenti filamenti di actina senza movimento attivo e sono coinvolte nei fenomeni di secrezione e di riassorbimento.

Il dominio basolaterale, invece, ha il compito di contattare le cellule e i tessuti circostanti. Questo dominio contiene la maggior parte delle proteine richieste per i processi cellulari fondamentali. È responsabile delle interazioni cellula-cellula ed è rappresentato da quella zona della membrana plasmatica che viene a contatto con il substrato. Il dominio basolaterale poggia, infatti, su uno strato di matrice extracellulare, detto anche lamina basale, al di sotto della quale si trova anche il tessuto connettivo (Fig. 3).

Il dominio apicale è separato da quello basolaterale grazie a giunzioni strette che circondano l'apice della cellula, mantengono intimamente unite due cellule adiacenti e impediscono la diffusione di lipidi e proteine tra i due domini di membrana. La distribuzione polarizzata di superficie delle proteine e dei lipidi può essere ottenuta grazie a due meccanismi principali: 1) smistamento selettivo, 2) ritenzione selettiva (Yeaman *et al.*, 1999; Matter, 2000).

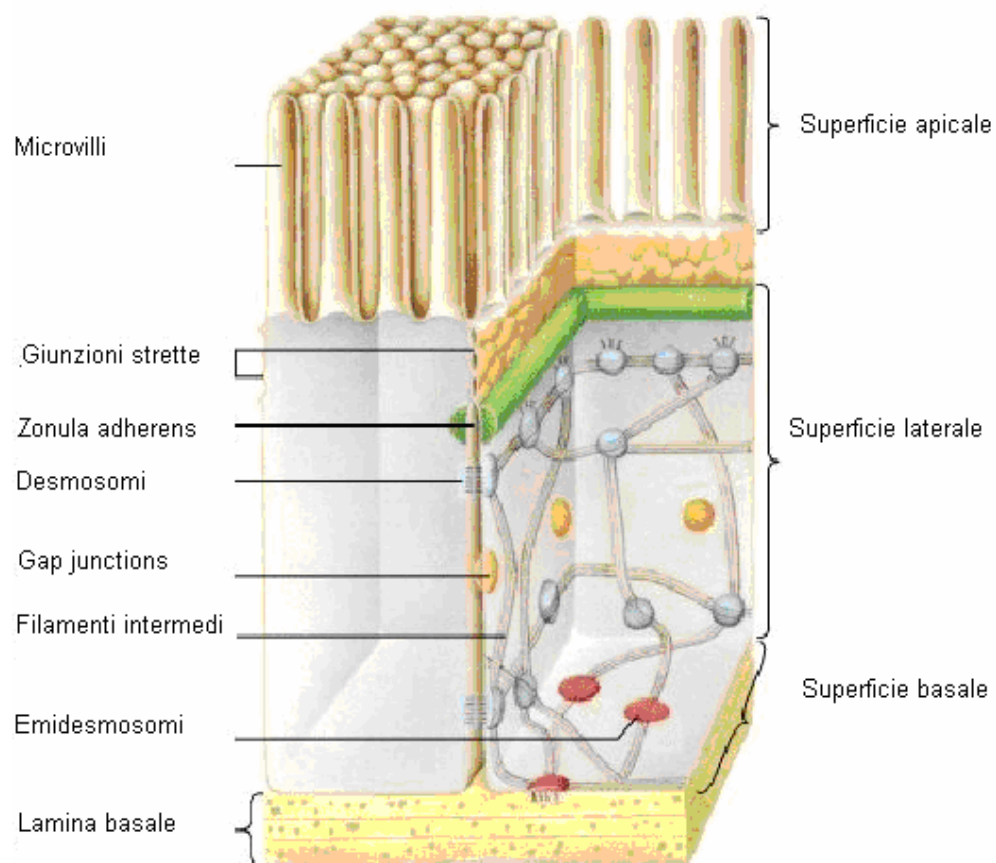


Fig. 3 La cellula epiteliale polarizzata.

Diagramma schematico di una cellula epiteliale dell'intestino. Il dominio basolaterale poggia sulla lamina, formata da collagene e proteoglicani. La superficie apicale è diretta verso il lume dell'intestino. La superficie laterale è caratterizzata dalla presenza di giunzioni strette che impediscono la diffusione delle molecole tra le cellule e tra il lume dell'intestino e la lamina, giunzioni "gap" che permettono lo scambio di molecole, zonula adherens, desmosomi e emidesmosomi che permettono il contatto cellula-cellula e cellula-matrice. In questa sequenza queste componenti formano l'asse apico-basale della cellula. (Da *Molecular Cell Biology*, Lodish H, fourth Edition, 2000).

Cellule MDCK: un modello di cellule epiteliali polarizzate

La prima osservazione delle proprietà vettoriali delle cellule epiteliali risale al 1940 circa quando un gruppo di fisiologi, usando traccianti radioattivi (Ussing and Zerahn, 1951) in combinazione con tecniche di elettrofisiologia (Galeotti, 1904, 1907), mostra che le cellule epiteliali possono trasportare in maniera vettoriale nutrienti contro gradienti elettrici e chimici. Nelle successive tre decadi, grazie alla microscopia elettronica e al lavoro pionieristico di George Palade viene descritta la complessa struttura asimmetrica delle cellule epiteliali, la polarizzazione degli organelli nella via secretoria (Palade, 1975) e i complessi giunzionali al confine delle regioni apicali e basolaterali della cellula (Farquhar and Palade, 1963). Il problema fondamentale di come le cellule epiteliali possano stabilire e conservare il loro fenotipo polarizzato diventa sperimentalmente approcciabile solo nel 1970 con la messa a punto nel laboratorio di David Sabatini di linee cellulari polarizzate e di sistemi di crescita su filtro. In particolare fu osservato che cellule di rene di cane, le cellule MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), formano uno strato resistente al passaggio della corrente elettrica quando piastrate su un substrato permeabile (Misfeldt *et al.*, 1976; Cereijido *et al.*, 1978). Il modello MDCK è stato rapidamente ottimizzato per studiare lo smistamento polarizzato di proteine con la scoperta che virus rivestiti si assemblano in maniera polarizzata al momento della loro fuoriuscita dalla cellula. Si scoprì che il virus dell'influenza si assembla a partire dal polo apicale mentre il virus della stomatite vescicolare dal polo basolaterale (Rodriguez-Boulan, 1978, 1980). Rapidamente si comprese che il “budding” polarizzato del virus dipendeva dalla distribuzione polarizzata delle maggiori glicoproteine del rivestimento virale (Rodriguez-Boulan *et al.*, 1983; Matlin and Simons, 1984; Rindler *et al.*, 1984; Rodriguez-Boulan *et al.*, 1984; Rodriguez-Boulan and Nelson, 1989). Si osservò infatti che l'emagglutinina del virus

dell'influenza (HA) veniva smistata alla superficie apicale delle cellule MDCK, mentre la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSVG) era smistata al polo basolaterale (Rodriguez-Boulán, 1978). Lo studio di cellule MDCK infettate dai virus ha portato all'identificazione della parte distale dell'apparato del Golgi, il TGN (Trans-Golgi Network) (Griffiths and Simons, 1986), come compartimento dove avviene lo smistamento nella via biosintetica tra la proteina apicale HA e la basolaterale VSVG (Matlin and Simons, 1984; Misek *et al.*, 1984; Rindler *et al.*, 1984; Wandinger-Ness *et al.*, 1990). Questo meccanismo vale per tutte le proteine a distribuzione polarizzata delle cellule epiteliali, infatti, sia le proteine apicali che quelle basolaterali sono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico (ER), quindi trasportate all'apparato del Golgi a livello del quale possono avvenire modifiche post-traduzionali. Dal Golgi passano nel TGN da cui vengono separate in vescicole di smistamento dirette alla membrana apicale o basolaterale..

Oltre alle cellule MDCK, un altro tipo di cellula epiteliale utilizzata per lo studio della polarità cellulare è la cellula FRT (Fischer Rat Thyroid), cellula di tiroide di ratto di Fischer (Nitsch and Wollman, 1980a, b; Chambard *et al.*, 1987; Garbi *et al.*, 1987; Mauchamp *et al.*, 1987). Le cellule FRT sono un modello eccellente per lo studio dei meccanismi di smistamento delle proteine ad ancora GPI. Infatti sebbene queste cellule indirizzino le proteine transmembrana apicali e basolaterali in maniera simile alle cellule MDCK (Zurzolo *et al.*, 1992a; Zurzolo *et al.*, 1992b; Zurzolo and Rodriguez-Boulán, 1993), esse differiscono da queste ultime in quanto smistano prevalentemente le loro proteine ad ancora GPI al loro polo basolaterale (Zurzolo *et al.*, 1993). Entrambe le linee cellulari, comunque, utilizzano prevalentemente una via di smistamento diretta dal Golgi alla membrana plasmatica (vedi

pagina 28) per indirizzare le proteine alla loro superficie apicale (Zurzolo *et al.*, 1992a).

I meccanismi che assicurano il trasporto dal TGN alla membrana plasmatica possono essere divisi in tre tappe fondamentali:

- Smistamento o segregazione delle proteine. Esso può avvenire a livello del TGN o ad un livello post-TGN, come gli endosomi di riciclaggio (Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005). Questa tappa è mediata dal riconoscimento di specifici segnali presenti nelle proteine stesse.
- Gemmazione e trasporto della vescicola verso la membrana.
- Ancoraggio e fusione della vescicola alla membrana plasmatica.

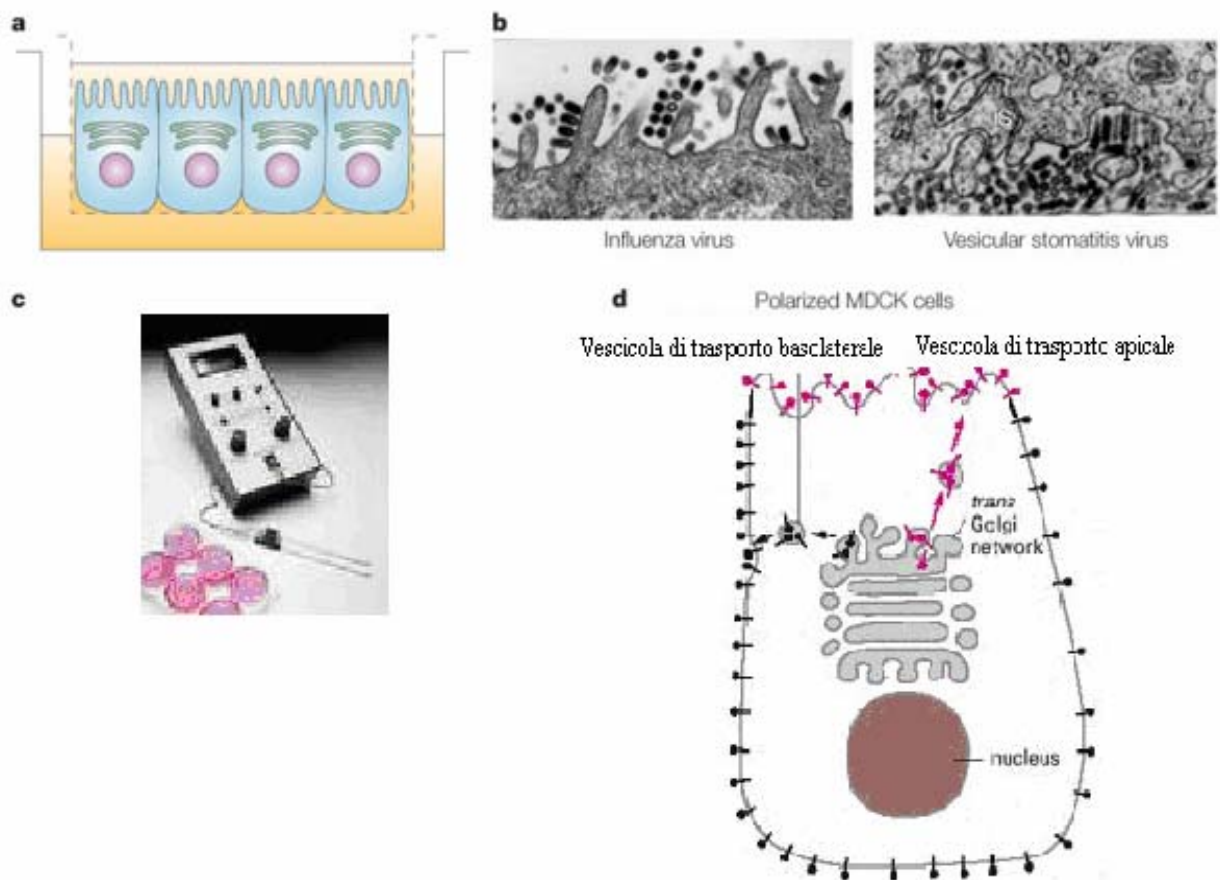


Fig. 4 La cellula MDCK, una cellula modello

A- Le cellule MDCK formano un monostrato resistente al passaggio della corrente elettrica. **B-** Distribuzione polarizzata dei rivestimenti glicoproteici del virus dell'influenza e della stomatite vescicolare **C-** Apparecchio Millipore(R) che permette di misurare la resistenza transepiteliale. **D-** I primi meccanismi di smistamento studiati nella cellula epiteliale sono stati quelli della via biosintetica delle proteine apicali e basolaterali. (Da Rodriguez-Boulton et al. *Nature Review*, 2005).

2- Meccanismi di acquisizione e di mantenimento della polarità cellulare.

L'asimmetria strutturale e molecolare di una superficie cellulare è stabilita in risposta a determinati stimoli spaziali intrinseci ed estrinseci. L'interpretazione dei segnali che derivano da questi stimoli genera compartimenti specializzati sulla membrana plasmatica e la successiva riorganizzazione della cellula attorno a questi siti definiti (Drubin and Nelson, 1996; Mostov, 2003).

L'acquisizione della polarità cellulare richiede tre tappe principali e consecutive: interpretazione, rafforzamento e propagazione dello stimolo iniziale.

Nelle cellule epiteliali lo stimolo spaziale che dà origine al processo di polarizzazione è l'adesione cellulare che determina la formazione di un primo dominio di membrana. Il compartimento della membrana plasmatica che viene a contatto con la superficie di adesione, sia essa la matrice extracellulare (ECM) o la membrana di un'altra cellula, diventa il dominio basolaterale delle cellule. Infatti le cellule epiteliali esprimono integrine e altri recettori per i vari componenti della ECM che contribuiscono a definire la superficie basale. Contemporaneamente il processo di adesione determina la formazione di una superficie libera che diventa il dominio apicale della cellula (Drubin and Nelson, 1996; Mostov, 2003). Una serie di studi condotti su *Drosophila* hanno dimostrato che la formazione della superficie apicale e basolaterale dipende anche dall'azione di tre gruppi di proteine localizzate a livello delle giunzioni strette (Knust and Bossinger, 2002; Bilder *et al.*, 2003; Tanentzapf and Tepass, 2003). Il complesso Par3/Par6/aPKC (atypical Protein Kinase C) definisce la superficie apicale promuovendo l'assemblaggio delle giunzioni strette. Successivamente il complesso proteico Crumbs/Stardust/Discs lost agisce antagonizzando il complesso

Scribble/Discs large e la proteina Lethal ad esso associata, che promuove lo sviluppo della superficie basolaterale. Inoltre durante lo sviluppo di *Drosophila* il trasporto delle vescicole di membrana alla superficie apicale è regolato da Crumbs e Klarsicht, una proteina motore simile alla dineina che regola il loro movimento sui microtubuli (Myat and Andrew, 2002).

La prima tappa nella determinazione della polarità cellulare è l'adesione della cellula al substrato mediata dall'azione di specifici recettori, situati sulla membrana plasmatica, i quali sono deputati alla ricezione dello stimolo di adesione. La regolazione temporo-spaziale di questi stimoli è necessaria in processi differenti quali la formazione di tessuti, la migrazione di cellule, la proliferazione e la metastatizzazione di tumori. In particolare le caderine di tipo I, di cui la E-caderina è il prototipo, mediano le adesioni cellula-cellula, formano giunzioni aderenti e sono associate con il citoscheletro di actina. Ciò determina l'attivazione di una rete di segnali che comprendono piccole GTP-asi, come Rho, chinasi e fosfatasi, a livello della superficie di contatto. Il legame delle molecole di adesione al citoscheletro rinforza l'adesione e propaga all'interno della cellula il segnale proveniente dallo stimolo esterno. La propagazione del segnale determina cambiamenti nell'organizzazione spaziale dei componenti del citoscheletro: ammassi di corti microtubuli e filamenti di actina orientati a caso si distribuiscono nel citoplasma apicale. Lunghi fasci di microtubuli con l'estremità positiva rivolta verso il citoplasma basale si dispongono parallelamente alla membrana laterale seguendo e definendo l'asse apico-basale della cellula. Il nuovo assemblaggio del citoscheletro modifica, inoltre, l'organizzazione spaziale dei componenti dell'apparato secretorio (apparato del Golgi, vescicole di trasporto) che, infatti, diventano ristretti a regioni specifiche del citoplasma in modo da essere più efficienti nell'indirizzare le proteine al corretto dominio della membrana plasmatica.

Una volta che l'asse apico-basale della cellula si è formato e si è ben definito, l'asimmetrica distribuzione molecolare della membrana plasmatica dipende dal continuo smistamento di molecole (proteine e lipidi) neosintetizzate e dalla loro internalizzazione regolata (Mellman, 1996). Per mantenere questa distribuzione polarizzata è necessario un sofisticato macchinario molecolare di smistamento che riconosca le proteine e le indirizzi al corretto dominio di residenza.

Segnali di smistamento:

Verso la fine degli anni '90 sono stati identificati i primi segnali di smistamento apicale e basolaterale che risultano essere localizzati all'interno delle proteine stesse. Per molto tempo i segnali basolaterali sono stati considerati dominanti su quelli apicali. Molti studi hanno dimostrato che l'inattivazione dello smistamento basolaterale risulta nell'indirizzamento delle proteine alla superficie apicale (Mostov *et al.*, 1986; Hunziker *et al.*, 1991; Gut *et al.*, 1998). Tuttavia la scoperta che la rimozione di alcuni determinanti basolaterali porta ad una localizzazione non-polarizzata delle proteine (Matter and Mellman, 1994; Thomas and Roth, 1994) e che alcuni segnali apicali sono dominanti su quelli basolaterali (Yeaman *et al.*, 1997; Ihrke *et al.*, 2001), suggerisce che le informazioni di smistamento apicale e basolaterale possono competere in un compartimento comune lungo la via esocitica.

1) segnali di smistamento basolaterali.

I primi segnali di smistamento identificati sono stati quelli localizzati su proteine basolaterali. I segnali basolaterali sono normalmente situati a livello del dominio citoplasmatico delle proteine e consistono prevalentemente di brevi sequenze amminoacidiche contenenti motivi di tirosina, leucina-leucina, leucina-valina, domini PDZ e caratteristici allineamenti

amminoacidici (Tab. 1). Il primo segnale basolaterale è stato identificato da Keith Mostov e collaboratori nel recettore polimerico dell'immunoglobulina A (pIgR) (Mostov *et al.*, 1986). La delezione del suo dominio citoplasmatico risulta nello smistamento apicale di questo recettore. Inoltre fu dimostrato che questo segnale è trasponibile. Infatti una sequenza di 17 amminoacidi della coda citoplasmatica del pIgR posta al C-terminale dell'apicale PLAP (placental alkaline phosphatase) è capace di delocalizzare questa proteina di fusione alla superficie basolaterale (Casanova *et al.*, 1991a).

La sostituzione di una tirosina con una cisteina nel dominio citoplasmatico dell'HA gli conferisce caratteristiche di smistamento basolaterale (Brewer and Roth, 1991) così come una tirosina vicina alla membrana nel dominio citoplasmatico di p75^{NTR} converte la proteina da apicale a basolaterale (Le Bivic *et al.*, 1991). Mutanti del recettore delle LDL hanno permesso di identificare, inoltre, due differenti segnali basolaterali, basati sulla presenza di una tirosina, di cui uno è anche coinvolto nell'endocitosi mediata da clatrina (Hunziker *et al.*, 1991).

Il motivo di doppia leucina come determinante di smistamento basolaterale è stato identificato per la prima volta nel trasportatore del glucosio GLUT4 (Corvera *et al.*, 1994), nel recettore V2 della vasopressina (Birnbaumer *et al.*, 1992) e nel recettore della porzione FC delle IgG (Matter and Mellman, 1994).

È stato dimostrato che questi segnali basolaterali sono anche i protagonisti della via biosintetica e di riciclaggio (Matter *et al.*, 1993; Aroeti and Mostov, 1994). Questi segnali, infatti, insieme ai segnali responsabili dell'endocitosi e del riciclaggio, fanno parte di una famiglia di peptidi-segnali che interagiscono con la famiglia dell'adattatore proteico AP (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003). Queste sono proteine adattatrici citosoliche che

riconoscono e si legano al segnale presente nelle code citosoliche delle proteine e mediano la loro localizzazione in vescicole di smistamento. Possono esistere sotto forma di tetramero (AP1, AP2, AP3 e AP4) o sotto forma monomerica (GGAs). AP1, AP2 e AP3, ma non AP4, mediano lo smistamento di vescicole ricoperte di clatrina (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003).

Site	Determinant	Polarity	Examples*
Cytoplasmic domain	Tyrosine-based motif	Basolateral	LDL receptor, transferrin receptor, vesicular stomatitis virus glycoprotein
	Dileucine motif	Basolateral	IgG Fc receptor, E-cadherin
	PDZ-binding motif	Apical/basolateral	CFTR (a), BGT-1 GABA transporter (bl), ERbB-2 receptor tyrosine kinase (bl)
	Others	Apical/basolateral	H,K-ATPase α -subunit (a), megalin (a), GAT-2 GABA transporter (bl)
Membrane anchor	Transmembrane domain	Apical	Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase
	GPI-anchor	Apical	Placental alkaline phosphatase, decay-accelerating factor, Thy-1
Extracellular domain	N-glycosylation	Apical	Occludin (truncated version), FcLR (Fc receptor-LDL receptor chimera), GLYT2 glycine transporter
	O-glycosylation	Apical	Neurotrophin receptor, sucrase isomaltase
	Oligomerization domain?	Apical?	Kv 1 potassium channel (neurons)

* a, apical; bl, basolateral.

Tab. 1 Determinanti per lo smistamento polarizzato di proteine di membrana. (Da Schuck and Simons, JCS, 2004)

2) segnali di smistamento apicali.

Contrariamente a quanto avviene per il traffico basolaterale, ancora non è stata dimostrata un'interazione di determinanti di smistamento apicale con adattatori citosolici o recettori. Inoltre non esistono sequenze consenso per i segnali apicali che invece comprendono una popolazione molto eterogenea. A differenza dei segnali basolaterali, localizzati esclusivamente sulla coda citosolica, putativi segnali di smistamento apicale possono risiedere nel dominio citoplasmatico, nell'ancora di membrana o nel dominio extracellulare delle proteine (Tab. 1).

Un primo gruppo di segnali apicali è rappresentato dagli *N*- (Scheiffele *et al.*, 1995) e *O*-glicani (Yeaman *et al.*, 1997; Alfalah *et al.*, 1999), aggiunti sull'ectodominio proteico da un meccanismo di glicosilazione post-traduzionale. Questi segnali sono presenti generalmente nelle vicinanze della regione transmembrana delle proteine. La loro delezione causa la redistribuzione di alcune proteine al polo basolaterale (Matter and Mellman, 1994; Fiedler and Simons, 1995; Yeaman *et al.*, 1997). Tuttavia non è chiaro se questi zuccheri agiscano direttamente come segnale o se in realtà modificano la struttura tridimensionale delle proteine per rendere accessibili altri segnali di smistamento (Rodriguez-Boulant and Gonzalez, 1999). Residui di *N*- e *O*-glicosilazione sembrano essere riconosciuti da lectine cellulari, in particolare la galettina-3, che media il trasporto polarizzato delle proteine a cui si legano (Fiedler and Simons, 1995; Delacour *et al.*, 2006).

Un altro possibile segnale di indirizzamento apicale risiede all'interno della coda citoplasmatica di proteine di membrana. Questo è il caso di due proteine a sette tratti transmembrana, quali la rodopsina (Chuang and Sung, 1998) e il trasportatore degli acidi biliari Na⁺-dipendente (Sun *et al.*, 1998). Infatti, rispettivamente 39 e 40 amminoacidi della

coda citoplasmatica di queste proteine sono in grado di smistare due differenti proteine basolaterali alla superficie apicale in cellule MDCK. È interessante notare che questi segnali sono specifici di questa classe di proteine in quanto non c'è una sequenza amminoacidica conservata tra i segnali presenti nelle due code citoplasmatiche.

Inoltre è stato osservato che la localizzazione apicale di alcuni trasportatori ionici, come il canale del cloro CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), dipende dall'interazione con proteine contenenti domini PDZ. In particolare il CFTR interagisce con la proteina apicale EBP50, contenente un dominio PDZ, grazie agli ultimi tre residui amminoacidici residenti nella sua coda citoplasmatica. La delezione di questi amminoacidi determina l'accumulo della proteina mutata sulla superficie basolaterale e sembra essere responsabile, in un piccolo numero di pazienti, della classica sintomatologia della fibrosi cistica (Moyer *et al.*, 1999; Moyer *et al.*, 2000).

Un caso particolare è quello delle proteine ad ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI-APs). Queste proteine sono associate al foglietto esterno della membrana plasmatica attraverso la loro ancora glicolipidica e sono localizzate in prevalenza sulla superficie apicale della maggior parte delle cellule epiteliali (Lisanti *et al.*, 1988). E' stato ipotizzato che l'ancora GPI agisse come segnale di smistamento apicale (Lisanti *et al.*, 1990). Diverse scoperte supportano questa ipotesi: 1) la sostituzione della porzione transmembrana e citoplasmatica di una proteina normalmente diretta al dominio basolaterale con un'ancora GPI determina lo smistamento della proteina di fusione al dominio apicale cambiando, quindi, il suo compartimento di destinazione finale (Brown *et al.*, 1989; Lisanti and Rodriguez-Boulan, 1990; Lisanti *et al.*, 1990); 2) l'inibizione della sintesi dell'ancora GPI con mannosammina determina la secrezione non polarizzata delle proteine GPI-ancorate (Lisanti *et al.*, 1991). Alla

fine del 1980 Van Meer e Simons hanno introdotto l'ipotesi dell'esistenza di microdomini lipidici di membrana o rafts (van Meer and Simons, 1988; Simons and Ikonen, 1997). Questa teoria ha rivoluzionato il concetto di smistamento apicale nelle cellule epiteliali e ha suggerito l'idea che l'ancora GPI agisca come segnale di smistamento apicale mediando l'associazione delle proteine GPI-ancorate ai rafts (Simons and Ikonen, 1997).

Recentemente, accanto a questi segnali strutturali, sono stati descritti dei segnali di smistamento apicale funzionali. Proteine GPI-ancorate richiedono la formazione di complessi ad alto peso molecolare, insieme all'associazione a rafts, per essere smistate correttamente sia in cellule MDCK che in cellule FRT. Questa oligomerizzazione sembra stabilizzare l'associazione delle proteine a rafts e favorire il raggruppamento di piccoli rafts per costituire una piattaforma funzionale di smistamento (Lipardi *et al.*, 2000; Helms and Zurzolo, 2004; Paladino *et al.*, 2004; Paladino *et al.*, 2006; Paladino *et al.*, 2007).

L'ipotesi dei rafts come piattaforma di smistamento apicale.

La membrana è un mosaico costituito da un doppio strato fluido di fosfoglicerolipidi nel quale flottano delle molecole proteiche, da cui l'espressione "modello a mosaico fluido" (Singer and Nicolson, 1972) (Fig. 5). Van Meer e Simons hanno proposto che le membrane biologiche non siano omogenee ma siano formate da diversi domini a composizione specializzata. In particolare hanno proposto l'esistenza di microdomini contenenti differenti lipidi che formano delle unità funzionali denominate "rafts" (Fig. 6). Trattamenti con detergenti non ionici come il Triton X-100 (TX-100) a 4°C hanno permesso di isolare frazioni di membrana, microdomini isolati (o DRM per "Detergent Resistant Microdomain"), che rappresentano l'equivalente biochimico dei rafts (Brown and Rose, 1992). La nozione di rafts, nozione di segregazione dinamica all'interno della membrana stessa, aggiunge un'ulteriore

dimensione al modello classico del mosaico fluido.

I rafts sono dei domini arricchiti in glicosfingolipidi (GSLs) e colesterolo residenti nel foglietto esterno del bilayer lipidico (Friedrichson and Kurzchalia, 1998; Varma and Mayor, 1998; Kurzchalia and Parton, 1999) che si pensa originino a livello del TGN. Questi microdomini si formerebbero spontaneamente tramite interazioni transienti tra i lipidi stessi (Harder and Simons, 1997). In particolare le interazioni idrofobiche che si stabiliscono tra le lunghe e sature catene aciliche degli sfingolipidi, insieme ai ponti idrogeno che si formano tra le loro teste polari, mediano l'impacchettamento di questi microdomini. Il colesterolo, invece, che è presente su entrambi i foglietti, svolge un importante ruolo come molecola linker (London and Brown, 2000); esso può determinare o amplificare la segregazione laterale dei lipidi in maniera dipendente dalla sua concentrazione in modo tale che i rafts costituiscano una distinta “fase liquida ordinata dispersa” in una “fase liquida disordinata” composta da glicerofosfolipidi con catene insature (Rietveld and Simons, 1998). Nonostante questo impacchettamento, i componenti dei rafts presentano una discreta mobilità laterale e rotazionale (Brown and London, 1998). Infatti vari studi hanno dimostrato che essi si muovono con una costante di diffusione relativamente alta di 0,6-0,9 $\mu\text{m}/\text{sec}$ in un'area confinata di 620-700 nm (Schutz *et al.*, 2000). Utilizzando sofisticate metodiche, quali single particle tracking (SPT) (Pralle *et al.*, 2000) e FRET (Fluorescence resonance energy transfer) (Varma and Mayor, 1998), è stato calcolato che i rafts formano delle strutture con diametro di circa 60-70 nm o addirittura di pochi nm (Sharma *et al.*, 2004). Sono tuttavia necessari ulteriori studi per comprendere come questi microdomini si formino e si organizzino.

A causa della distribuzione polarizzata dei lipidi, nelle cellule epiteliali e nei neuroni i rafts si accumulano sulla superficie apicale e su quella assonale rispettivamente, mentre sono presenti

in quantità minori su quella basolaterale e sulle membrane dendritiche (Simons and Ikonen, 1997).

Varie proteine sono state trovate arricchite nei rafts, tra cui proteine GPI-ancorate, proteine doppiamente acilate, proteine legate al colesterolo o all'acido palmitoleico e proteine con un dominio transmembrana particolarmente idrofobico.

Per la loro capacità di segregare specifiche proteine e lipidi in domini spazialmente ristretti, i rafts giocano un ruolo importante in molti processi cellulari, quali lo smistamento, il traffico di membrana e la trasduzione del segnale (Simons and Toomre, 2000). Una serie di patogeni come virus, prioni e parassiti possono penetrare nelle cellule attraverso un meccanismo di endocitosi che coinvolge sia gli sfingolipidi (Nieva *et al.*, 1994) che il colesterolo (Phalen and Kielian, 1991), i principali componenti dei rafts.

Sulla base del fatto che le proteine GPI-ancorate sono localizzate all'apice della maggior parte degli epitelii (Brown *et al.*, 1989; Lisanti *et al.*, 1989b; Lisanti *et al.*, 1990) e sono associate a rafts durante il loro trasporto alla superficie (Brown and Rose, 1992), è stato proposto che i rafts formino una piattaforma di smistamento che faciliterebbe l'incorporazione selettiva delle proteine nella via apicale (Simons and Ikonen, 1997). Il TGN, quindi, rappresenterebbe una sorta di stazione di smistamento che forma vescicole di trasporto apicali composte da un raggruppamento di lipidi in grado di reclutare proteine apicali (Simons and van Meer, 1988; Wandinger-Ness *et al.*, 1990). Tuttavia è stato dimostrato che in cellule epiteliali FRT la maggior parte delle proteine GPI-ancorate sono smistate alla superficie basolaterale (Zurzolo *et al.*, 1993). Inoltre recentemente è stato trovato che anche in cellule MDCK proteine GPI-ancorate sono smistate sia all'apice che alla base sebbene entrambe associno a DRM durante la loro biosintesi (Paladino *et al.*, 2004). Ciò indica che l'associazione delle proteine GPI-

ancorate ai rafts non è sufficiente a determinare lo smistamento apicale.

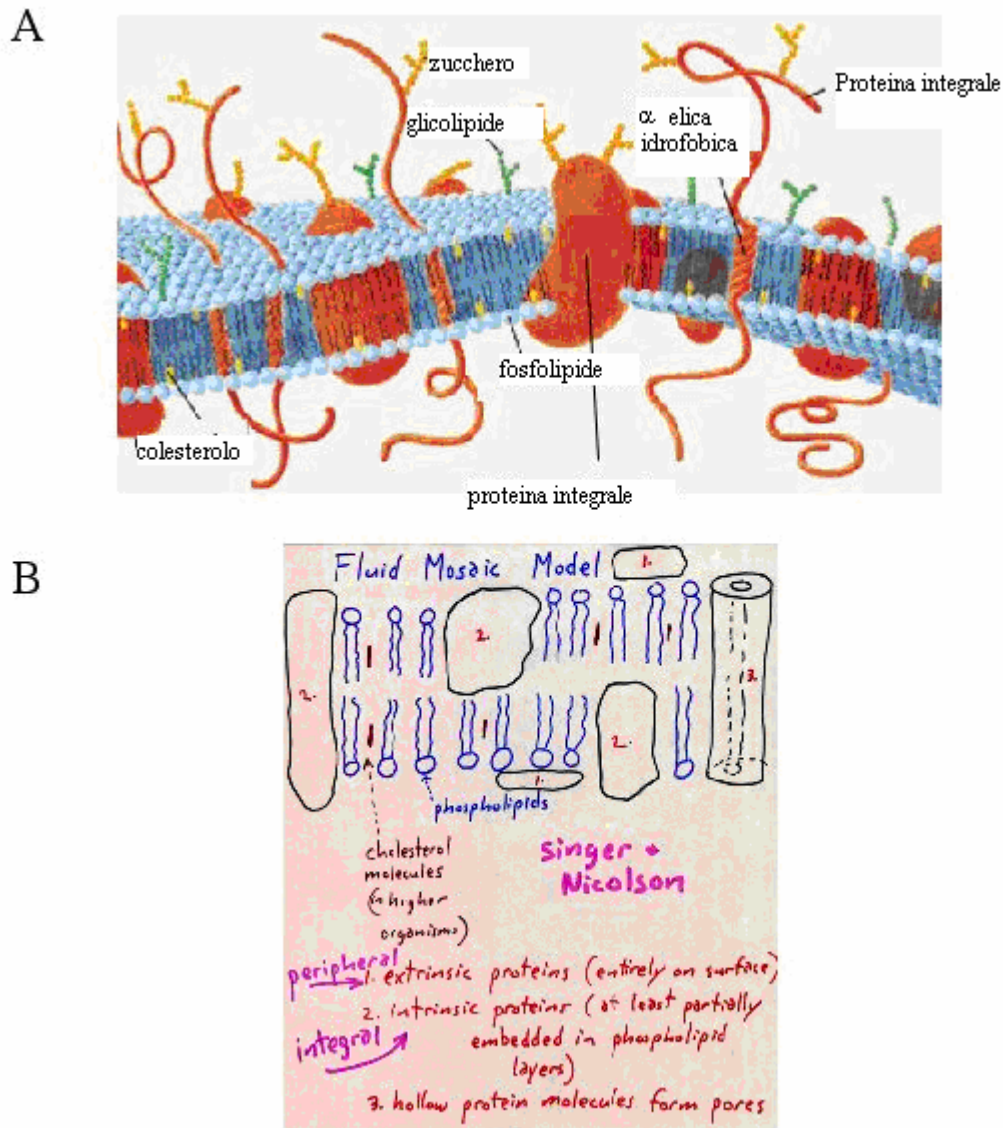


Fig. 5 Modello del “mosaico fluido”

A- Modello del mosaico fluido. Le proteine integrali sono delle proteine transmembrana. **B-** Schema originale di Singer e Nicolson. (Da Singer e Nicolson, *Science*, 1992).

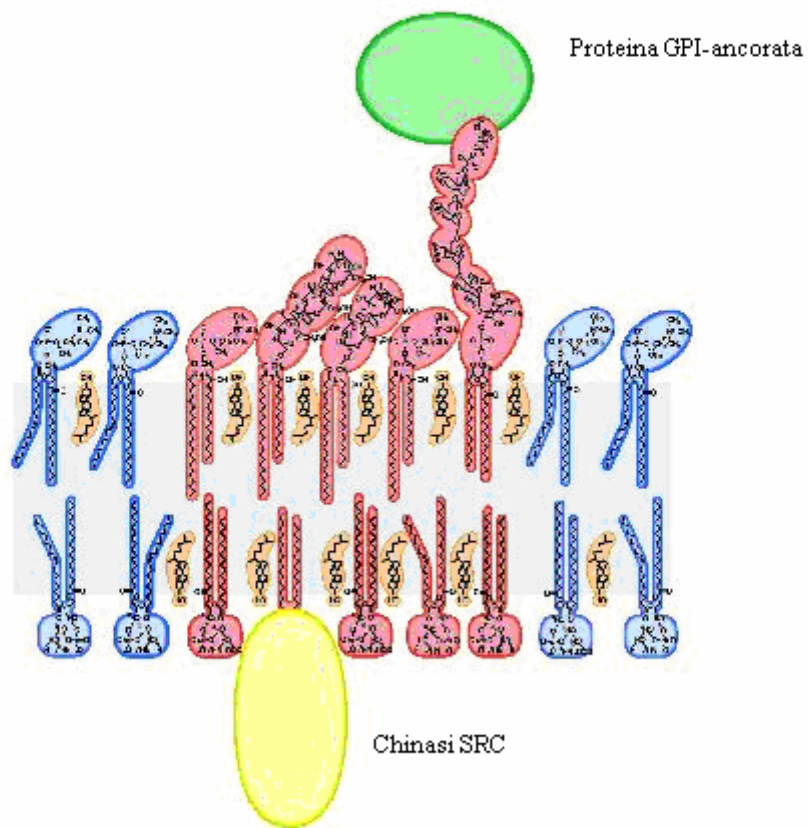


Fig. 6 I “rafts”

Schema di un rafts. I lipidi insaturi sono indicati in blu, i saturi in rosso e il colesterolo in arancio. (*Da Singer e Nicholson, Science, 1972*).

Dal Golgi alla membrana plasmatica: smistamento diretto e indiretto (o transitosi).

Proteine apicali e basolaterali attraversano il Golgi insieme fino al raggiungimento del TGN. Raggiunto questo livello possono essere smistate verso la membrana apicale o basolaterale tramite una via diretta di esocitosi o possono passare attraverso una stazione intermedia, gli endosomi di riciclo, immediatamente dopo la loro uscita dal TGN (Ang *et al.*, 2004). Il risultato è una complicata mappa di traffico intracellulare, semplificata in Fig. 7. Gli endosomi di riciclo possono anche essere il principale punto di smistamento delle proteine di membrana che sono internalizzate a livello della superficie apicale o basolaterale (Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005). Accanto a queste vie, esiste un'ulteriore modalità attraverso cui proteine e lipidi raggiungono la corretta superficie di residenza nelle cellule epiteliali: la via indiretta o di transitosi. In questa via le proteine sono inviate prima a una superficie, più comunemente quella basolaterale. Da qui sono endocitate e raggiungono il compartimento in cui trovano la loro localizzazione definitiva passando attraverso gli endosomi precoci e poi attraverso gli endosomi di riciclo (Rodriguez-Boulán and Powell, 1992; Mostov *et al.*, 2000). Le proteine che seguono la via di transitosi posseggono segnali specifici (Casanova *et al.*, 1990; Mostov *et al.*, 2000). Le proteine basolaterali seguono quasi esclusivamente il trasporto diretto mentre quelle apicali possono utilizzare l'una o l'altra via. L'enzima dipeptidilpeptidasi IV (DPPIV) e l'HA, entrambi apicali, in cellule MDCK seguono la via diretta dal Golgi alla membrana, mentre negli epatociti, nelle cellule dell'intestino e della retina utilizzano il meccanismo della transitosi (Casanova *et al.*, 1991b; Bonilha *et al.*, 1997). Nelle cellule epiteliali FRT, DPPIV oscilla dall'utilizzo della via indiretta a quella diretta nel corso della maturazione dell'epitelio (Zurzolo *et al.*, 1992a). L'utilizzo delle diverse vie, in definitiva, dipende dal tipo di proteina, dal tipo di cellula e dallo stato differenziativo della cellula stessa (Zurzolo *et al.*, 1992a;

Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005). Inoltre linee cellulari epiteliali differenti possono dirigere la stessa proteina verso domini diversi. Queste proprietà, insieme, contribuiscono a formare il cosiddetto “fenotipo epiteliale flessibile” (Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005). Inoltre è stato dimostrato che per tutte le vie utilizzate elementi del citoscheletro giocano un ruolo importante nel trasporto delle proteine verso la membrana plasmatica.

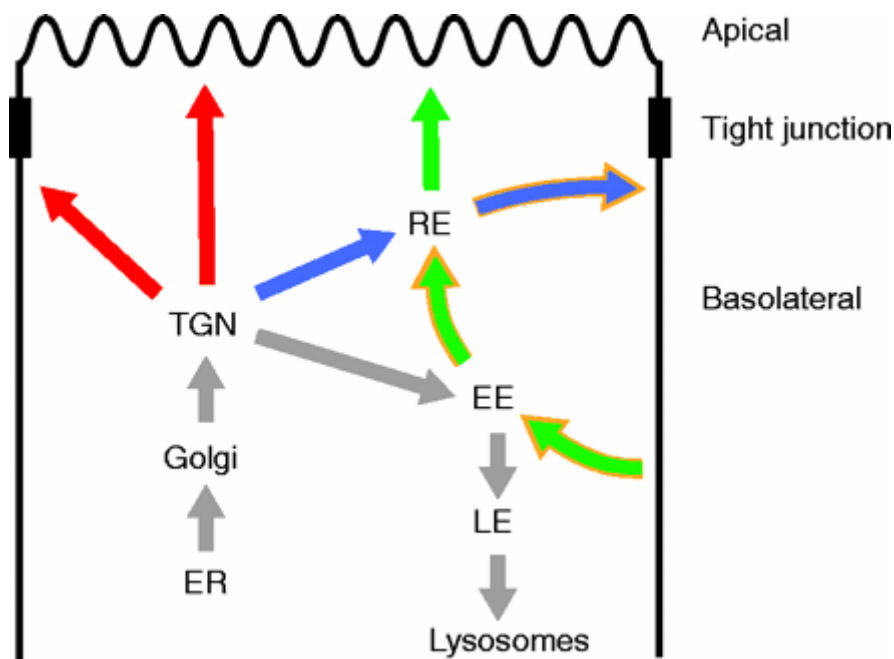


Fig. 7 Differenti vie di smistamento in cellule epiteliali

Dal TGN proteine e lipidi possono essere trasportati direttamente alla membrana apicale o basolaterale (in rosso). Le vescicole basolaterali possono anche raggiungere la membrana plasmatica attraverso gli endosomi (in blu). La via di transitosi è indicata in verde. Le frecce con contorno in oro costituiscono la via di riciclo basolaterale. EE, endosomi precoci; ER, reticolo endoplasmatico; LE, endosomi tardivi; RE, endosomi di riciclo; TGN, trans-Golgi network. (Da Schuck and Simons, *JCS*, 2004).

Ruolo del citoscheletro e trasporto alla membrana plasmatica.

I microtubuli e i microfilamenti di actina, insieme ad una serie di proteine associate ad essi, svolgono un ruolo importante nelle vie di traffico intracellulare di cellule epiteliali.

Già nel 1987 Rindler e collaboratori hanno mostrato che l'utilizzo di un agente chimico in grado di depolimerizzare i microtubuli in cellule MDCK porta ad uno smistamento non polarizzato del virus HA, normalmente apicale, mentre la polarità del virus VSVG resta inalterata (Rindler *et al.*, 1987).

Anche alcuni motori molecolari specifici dei microtubuli sono stati coinvolti nel trasporto delle proteine alla superficie apicale. Anticorpi specifici diretti contro la chinesina e in grado di bloccarne la funzione, alterano il trasporto apicale della proteina chimerica p75^{NTR}-GFP (Kreitzer *et al.*, 2000). La dineina risulta essere implicata nel trasporto apicale della proteina rodopsina in cellule MDCK (Tai *et al.*, 1999). Ancora, KIFC3, una proteina motore molecolare dei microtubuli appartenente alla famiglia delle chinesine, è stata associata al trasporto apicale del virus HA e dell'annessina-13b (Noda *et al.*, 2001).

Se i microtubuli sembrano giocare un ruolo fondamentale nel trasporto delle proteine verso la membrana apicale, un altro componente del citoscheletro, l'actina, sembra essere importante nello smistamento delle proteine basolaterali. L'inibizione della polimerizzazione dell'actina provoca la delocalizzazione di proteine normalmente basolaterali verso la membrana apicale (Durrbach *et al.*, 2000; Sheff *et al.*, 2002). Proteine motrici o proteine associate ai microtubuli di actina sono anche coinvolte nel trasporto basolaterale. L'espressione di una forma dominante negativa di Cdc42, una proteina della famiglia delle Rho GTPasi implicata nel rimodellamento dell'actina, inibisce lo smistamento post-golgiano e il riciclo dagli endosomi delle proteine basolaterali VSVG e GP58, senza interferire nello smistamento della proteina

apicale gp114 (Kroschewski *et al.*, 1999). I microtubuli e i microfilamenti di actina sono capaci di influenzare rispettivamente il trasporto apicale e basolaterale delle proteine nelle cellule epiteliali, tuttavia il meccanismo preciso attraverso cui agiscono e attraverso cui sono regolati, resta ancora da chiarire (Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005).

Fusione delle vescicole alla membrana.

Arrivate alla membrana plasmatica, le vescicole apicali e basolaterali devono ancorarsi e fondersi con essa. La specificità del riconoscimento vescicola-membrana è assicurata dall'interazione tra le SNAREs. Le SNAREs (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein (SNAP) receptor) sono delle proteine transmembrana con un dominio elicoidale di 60-70 amminoacidi, molto conservato, chiamato dominio SNARE (Sutton *et al.*, 1998). Esse possono essere divise in vescicole-SNAREs o v-SNAREs, connesse alla sinaptobrevina o VAMP (vesicle associated membrane protein), una proteina localizzata sulle vescicole sinaptiche, e target-SNAREs o t-SNAREs, connesse alla sintassina-1 e SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa). V- e t-SNAREs non sono sufficienti per assicurare il processo di fusione e richiedono proteine accessorie per l'esocitosi (Pfeffer, 1999; Chen and Scheller, 2001) La fusione della vescicola con la membrana può essere riassunta in quattro tappe.

Nella prima tappa proteine di ancoraggio localizzate sulla vescicola e sulla membrana bersaglio interagiscono tra loro e con una proteina Rab, legata ad un GTP, permettendo l'interazione o "tethering".

L'allontanamento della proteina Sec1p/Munc18, della famiglia SM, interviene nella seconda tappa, il "priming", cioè l'associazione della t-SNARE con la SNAP25.

Al “priming” segue il “docking”, cioè l’associazione della t-SNARE, SNAP25 e della v-SNARE per formare il cosiddetto complesso SNARE. E’ a questo punto che le due membrane si avvicinano permettendo la fusione dei doppi strati lipidici.

L’ultima tappa consiste nel riversamento del contenuto della vescicola.

Le cellule epiteliali polarizzate rappresentano un modello interessante per studiare la specifica funzione delle SNAREs in quanto le t-SNAREs della membrana plasmatica sono localizzate diversamente in questi tipi di cellule. La t-SNARE syntaxina 3 (Stx3) è localizzata alla membrana apicale, mentre la syntaxina 4 (Stx4) si trova principalmente alla membrana basolaterale di cellule MDCK (Low et al., 1996). Diversamente SNAP23 e syntaxina 2 (Stx2) possono essere trovate in entrambi i domini di membrana (Low et al., 1998). Stx3 e SNAP23 formano il complesso apicale t-SNARE e interagiscono con la v-SNARE TI-VAMP (tetanus-neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein) in cellule Caco2 (Galli et al., 1998). Stx3 and TI-VAMP sono importanti per il trasporto apicale di proteine transmembrana e secretorie che seguono la via diretta sia in cellule MDCK che in cellule Caco2 (Casanova et al., 1991a; Low et al., 1998; Lafont et al., 1999; Breuza et al., 2000). Dati del nostro laboratorio dimostrano che TI-VAMP è necessario per la corretta localizzazione alla membrana apicale anche delle proteine ad ancora GPI che utilizzano la via diretta indipendentemente dalla loro modalità di sorting (se sono rafts dipendenti o rafts indipendenti). Inoltre da questo studio è emerso che TI-VAMP non è coinvolta nello smistamento apicale delle proteine che utilizzano la via indiretta. La via transcitotica è infatti regolata dalla v-SNARE VAMP8 che può associarsi a t-SNAREs apicali e basolaterali (Pocard et al., 2007).

3- Smistamento di proteine ad ancora GPI.

Le proteine ad ancora GPI.

Le proteine della via secretoria possono essere inserite nella membrana attraverso vari meccanismi. Le proteine transmembrana attraversano lo strato lipidico con i loro polipeptidi idrofobici. Le proteine possono essere inserite nella membrana anche attraverso modificazioni lipidiche post-traduzionali. La maggior parte di queste modifiche avviene nel citoplasma e consiste nell'addizione di isoprenoidi o di acidi grassi alle proteine. Il palmitato e il colesterolo possono essere aggiunti alle proteine nel lume dell'ER (Mann and Beachy, 2000). Un'altra classe di modifiche lipidiche che può avvenire a livello del lume dell'ER è l'attacco di un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo (GPI). Queste ancore sono ubiquitarie tra gli eucarioti e particolarmente abbondanti nei protozoi (Tab. 2). Le proteine sono attaccate all'ancora di GPI con il loro dominio C-terminale che resta rivolto verso l'ambiente extracellulare. L'ancora GPI può essere considerata come un'alternativa al singolo dominio transmembrana di proteine integrali di membrana di tipo 1.

Le prime ipotesi sull'esistenza di un'ancora fosfolipidica risalgono agli anni '70 quando i laboratori di Ikezawa e Low (Ikezawa *et al.*, 1976; Low and Finean, 1977, 1978; Low and Zilversmit, 1980; Taguchi *et al.*, 1980) mostrano che la fosfolipasi C batterica fosfatidilinositolo-specifica, nella sua forma altamente purificata, è capace di rilasciare dalla membrana plasmatica di cellule di mammifero certi enzimi, come la fosfatasi alcalina e la 5'-nucleotidasi. Nel 1985 studi strutturali sull'acetilcolinesterasi umana e bovina, su Thy-1 di ratto e su VSG (variant surface glycoprotein) di *Trypanosoma brucei*, permettono di confermare questa predizione (Cardoso de Almeida and Turner, 1983; Holder, 1983; Roberts

and Rosenberry, 1985). Per avere la prima struttura completa di un'ancora GPI bisogna aspettare il 1988 quando Mike Ferguson e Steve Homans risolvono la composizione della GPI della VSG di *T.brucei* e di Thy-1 di ratto (Ferguson *et al.*, 1988; Homans *et al.*, 1988).

L'attacco dell'ancora GPI è mediato dall'azione di una transamidasi che taglia il legame peptidico al sito di attacco dell'ancora e crea un legame ammidico tra l'etanolamina del GPI e il nuovo gruppo carbossilico generato all'estremità del precursore proteico tagliato. La sequenza amminoacidica della proteina deve contenere: a) un segnale di secrezione idrofobico all'N-terminale che indirizza la proteina all'ER; b) una sequenza segnale di attacco dell'ancora GPI all'N-terminale. L'amminoacido al quale l'ancora viene legata è detto “ ω site”, quello al suo N-terminale “ ω -minus” e quello al suo C-terminale “ ω -plus”. La sequenza segnale dell'ancora possiede delle caratteristiche generali quali: a) una sequenza di circa 10 amminoacidi polari che forma una regione linker flessibile; b) l'amminoacido $\omega+2$ è predominantemente una G, A o S; c) una regione spaziatrice di amminoacidi moderatamente polari (da $\omega+3$ a $\omega+9$ o più); d) una sequenza di amminoacidi idrofobici variabile in lunghezza ma capace di attraversare la membrana (Udenfriend and Kodukula, 1995; Eisenhaber *et al.*, 1998) (Fig. 8).

Le ancore GPI possono avere strutture diverse ma hanno una composizione del core comune, conservata tra le varie specie (Ikezawa, 2002), che consiste in uno scheletro di EtNP-6Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6(PI). La proteina è attaccata ad un residuo di mannosio distale, non riducente, attraverso un ponte di fosfoetanolamina (EtNP) tra il mannosio 6-idrossile e il gruppo α -carbossilico dell'amminoacido C-terminale. Un residuo di glucosammina terminale riducente del core dell'ancora è legato al D-*myo*-inositolo della porzione di fosfatidilinositolo (PI). Questa struttura altamente conservata dell'ancora GPI è

modificata dall'aggiunta di addizionali residui di fosfoetanolammine e da lineari e ramificate catene laterali glucidiche, specie e tessuto-specifici (Ferguson and Williams, 1988).

Protozoi VSG di <i>Trypanosoma brucei</i> Mucina GPI-ancorata di <i>Trypanosoma cruzi</i> Proteofosfoglicani-GPI di <i>Entamoeba histolytica</i>	Funzione Rivestimento protettivo Invasione della cellula ospite Fattore di virulenza
Lieviti e funghi alpha-agglutinina di <i>Saccharomyces cerevisiae</i> GEL1P di <i>Aspergillus fumigatus</i> HWP1 di <i>Candida albicans</i>	Molecola di adesione Biogenesi della parete cellulare Molecola di adesione
Mammiferi CD59 e DAF Fosfatasi alcalina 5'-nucleotidasi NCAM-120 subunità- α di CNTFR Proteina prionica	Regolazione del complemento Idrolasi della superficie cellulare Idrolasi della superficie cellulare Molecola di adesione Recettore neuronale Sconosciuta

Tab. 2 Alcuni esempi di proteine ad ancora GPI.

La biosintesi dell'ancora GPI può essere divisa in tre tappe principali: a) pre-assemblaggio del precursore nella membrana dell'ER; b) attacco dell'ancora GPI alla proteina nuovamente sintetizzata nel lume dell'ER con concomitante taglio del peptide segnale di attacco della GPI al C-terminale; c) modifiche lipidiche e glucidiche nell'ER e nell'apparato del Golgi. Il primo step della biosintesi della GPI coinvolge il trasferimento di GlcNAc (N- acetil glucosammina) dall'UDP-GlcNAc al PI (Doering *et al.*, 1989) per ottenere GlcNAc-PI grazie ad un complesso di *N*-acetylglucosaminyltrasferasi (Milne *et al.*, 1992). Ciò avviene sul lato citoplasmatico

dell'ER, così come il secondo step, l'*N*-acetilazione del GlcNAc-PI a GLcN-PI mediata da un'acetilasi (Milne *et al.*, 1994). A questo punto l'assemblaggio della GPI coinvolge l'azione di mannosiltrasferasi, inositol aciltrasferasi/deacetilasi e fosfoetanolamina trasferasi nel lume dell'ER (Menon *et al.*, 1990; Guther and Ferguson, 1995). Il trasferimento del precursore GPI maturo alla proteina attraverso una GPI transamidase richiede la traslocazione del glicolipide nell'ER, dove un peptide segnale di attacco della GPI al COOH-terminale è direttamente rimpiazzato dalla formazione di un legame ammidico all'amminogruppo del ponte di fosfoetanolamina (Kodukula *et al.*, 1995; Ramalingam *et al.*, 1996).

L'abbondanza di proteine GPI-ancorate riflette la diversità di funzione che esse hanno sia in protozoi che in cellule di mammifero. Nei funghi la sintesi dell'ancora GPI è essenziale per la vitalità della cellula, probabilmente perché alcune mannoproteine della loro parete cellulare richiedono un'ancora GPI per essere covalentemente incorporate nella parete cellulare stessa (Leidich *et al.*, 1994; Brul *et al.*, 1997). In alcuni protozoi, proteine GPI ancorate hanno un ruolo importante nella vitalità cellulare e nella difesa contro il sistema immune dell'ospite e sono tra le più abbondanti proteine della superficie cellulare in questi organismi (Ferguson, 1999). Nelle cellule animali, invece, il gruppo GPI agisce come un'ancora di membrana che fornisce alle proteine GPI-ancorate la capacità di trasdurre il segnale attraverso il bilayer lipidico determinando una serie di effetti intracellulari: danno ossidativo, influsso degli ioni Ca, fosforilazione delle proteine in residui di tirosina, secrezione di citochine, proliferazione o inibizione della crescita cellulare, ecc. (Robinson, 1991, 1997). Per trasdurre il segnale in alcuni casi le proteine GPI-ancorate interagiscono specificamente con proteine transmembrana coinvolte nel traffico intracellulare e sembrano modulare l'interazione ligando-recettore e la capacità di queste proteine transmembrana di trasmettere segnali intracellulari. Ad esempio l'attivazione di Ret, un recettore transmembrana tirosino-

chinasi coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso e dell'apparato escretore, indotta da GDNF (glial cell line-derived trophic factor) è mediata da GDNFR α (Jing *et al.*, 1996), una proteina GPI-ancorata.

Molte proteine di adesione cellulare sono GPI-ancorate e sono essenziali nei vari stadi dello sviluppo cellulare. Infatti mutazioni del gene PIGA, codificante per una subunità dell'enzima GPI-N-acetilglicosammina transferasi che catalizza il primo step della sintesi dell'ancora GPI, sono responsabili dell'Emoglobinuria Parossistica Notturna (PNH), un disordine acquisito delle cellule staminali ematopoietiche (Takeda *et al.*, 1993). Quando le proteine GPI non sono correttamente ancorate, rimangono a livello intracellulare e l'assenza di esse sulla superficie delle cellule del sangue le rende più sensibili alla lisi complemento-mediata (Inoue *et al.*, 2003). Anche il sistema nervoso è un vasto repertorio di molecole di adesione GPI-ancorate alcune delle quali, come NCAM e ApCAM, esistono in due isoforme: una transmembrana ed una GPI-ancorata. La differente espressione, degradazione o localizzazione di queste forme può avere un significato funzionale. Ad esempio, la forma transmembrana di ApCAM promuove la fascicolazione degli assoni mentre la forma GPI-ancorata stabilizza il contatto sinaptico (Martin and Kandel, 1996). Ancora, l'isoforma GPI-ancorata dell'Antigene Umano Carcinoembrionale (CEA) è overespressa nelle cellule cancerose dove l'isoforma transmembrana è downregolata (Boucher *et al.*, 1989). Probabilmente l'espressione ectopica dell'isoforma GPI-ancorata del CEA determina l'inibizione della differenziazione miogenica mentre la forma transmembrana promuove la differenziazione (Screaton *et al.*, 2000) suggerendo che la forma transmembrana agisce come un tumor-suppressor (Chatterjee and Mayor, 2001). Infine la proteina prionica endogena è GPI ancorata e si pensa che cambiamenti conformazionali che subisce quando è mutata nella sua forma aberrante che

causa l'encefalopatie spongiforme bovina possa essere associata alla via endocitica clatrina-indipendente seguita da questa proteina GPI nei neuroni. La maggior parte delle proteine GPI-ancorate sono localizzate sulla superficie cellulare e si affacciano nello spazio extracellulare.

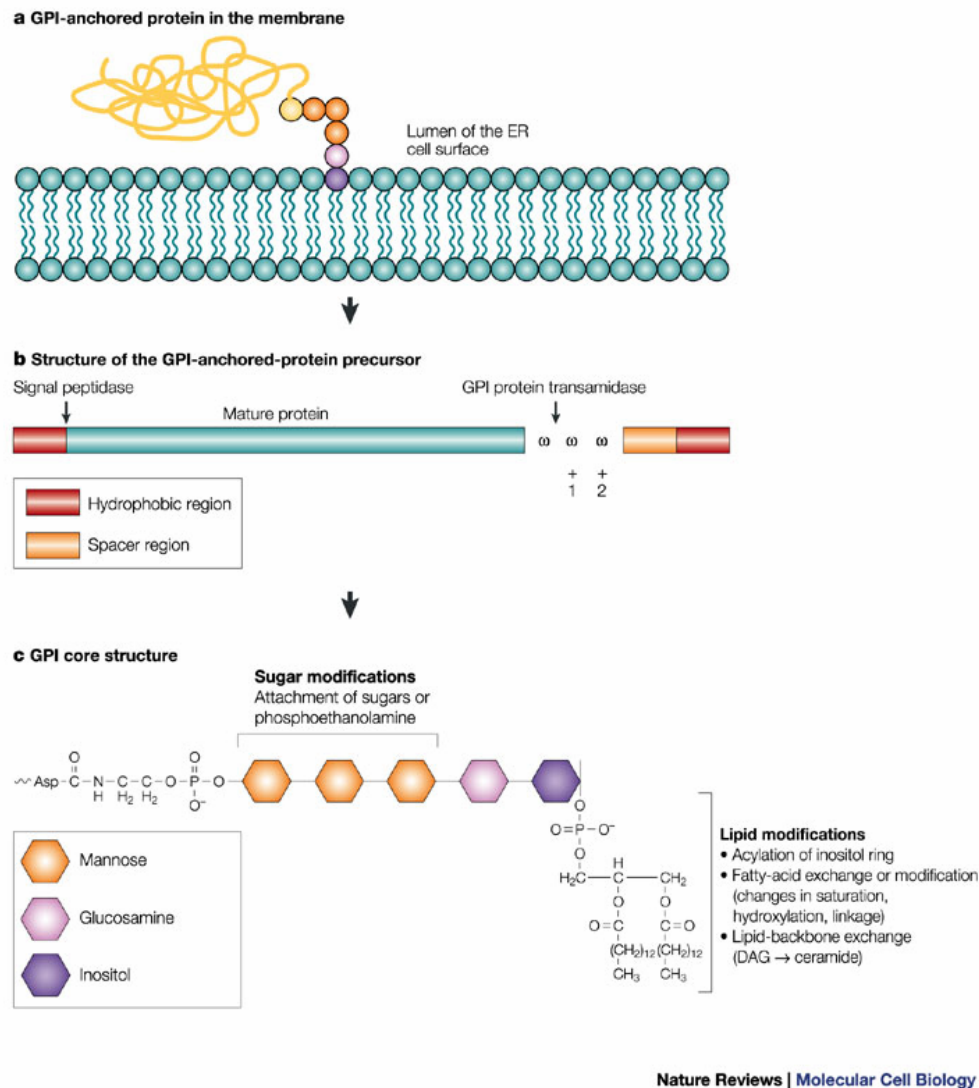


Fig. 8 Precursore della proteina ad ancora GPI e struttura dell'ancora

A. Proteine ad ancora GPI sono inserite nel foglietto esterno della membrana cellulare attraverso la loro porzione glicolipidica, mentre l'ectodominio è rivolto verso lo spazio extracellulare. **B.** Proteine GPI ancorate sono sintetizzate come un precursore contenente una sequenza segnale ammino-terminale idrofobica, che l'indirizza al lume dell'ER, e una sequenza segnale al C-terminale che dirige l'ancoraggio della GPI. **C.** Il core conservato consiste di una fosfoetanalammina in un legame ammidico al C-terminale della proteina, tre residui di mannosio, una glucosammina e il fosfatidilinositolo. (Da Mayor and Riezman, *Nature*, 2004).

Metodi analitici per l'analisi delle strutture di ancore GPI.

Le prime caratterizzazioni strutturali complete delle ancore di GPI si basavano essenzialmente su studi di ^1H -NMR bidimensionali. Questo tipo di analisi, tuttavia, richiede una quantità relativamente abbondante di materiale di partenza (> 50 nmoli). Alla fine degli anni '90 sono stati descritti metodi analitici in grado di dare dettagliate informazioni strutturali partendo da una quantità di materiale relativamente piccola (1-50 nmoli) che prevedono reazioni di digestione chimiche ed enzimatiche (Schneider and Ferguson, 1995; Zitzmann and Ferguson, 1999). Notevoli avanzamenti nelle tecniche per l'analisi di strutture complete di ancore sono stati possibili con l'avvento della spettrometria di massa. Infatti, una decade dopo la scoperta dell'elettrospray e della ionizzazione MALDI (matrix-assisted laser desorption ionisation), metodi che permettono una ionizzazione gentile di grosse biomolecole, la spettrometria di massa è diventata uno strumento molto potente per l'analisi delle proteine e una tecnologia chiave nell'emergente campo della proteomica. Il successo della spettrometria di massa è dovuto sia al design innovativo degli strumenti, soprattutto quelli basati sul principio del tempo di volo, sia ad un'ampia gamma di strategie biochimiche che si servono della spettrometria di massa per analizzare proteine, carboidrati, o altre biomolecole. Grazie a strategie ormai stabilite, oggi è possibile caratterizzare interi complessi proteici, vie di trasmissioni di segnali, interi organelli, mentre si riscontrano ancora difficoltà per l'analisi di modifiche post-traduzionali.

Uno spettrometro di massa è un'apparecchiatura analitica in grado di separare ioni molecolari in base al loro rapporto massa-carica, determinando in questo modo il peso molecolare dei composti chimici analizzati. La figura 9 rappresenta uno schema dei componenti di base di uno spettrometro di massa. Una volta introdotto nello strumento, il campione è sottoposto a

ionizzazione nella fonte/sorgente ionizzante. Le molecole cariche così prodotte sono quindi accelerate elettrostaticamente nel filtro/analizzatore di massa che separa gli ioni in base al loro rapporto massa-carica (m/z). Gli ioni che raggiungono il detector sono registrati e il segnale è trasferito ad un computer che processa e conserva i dati.

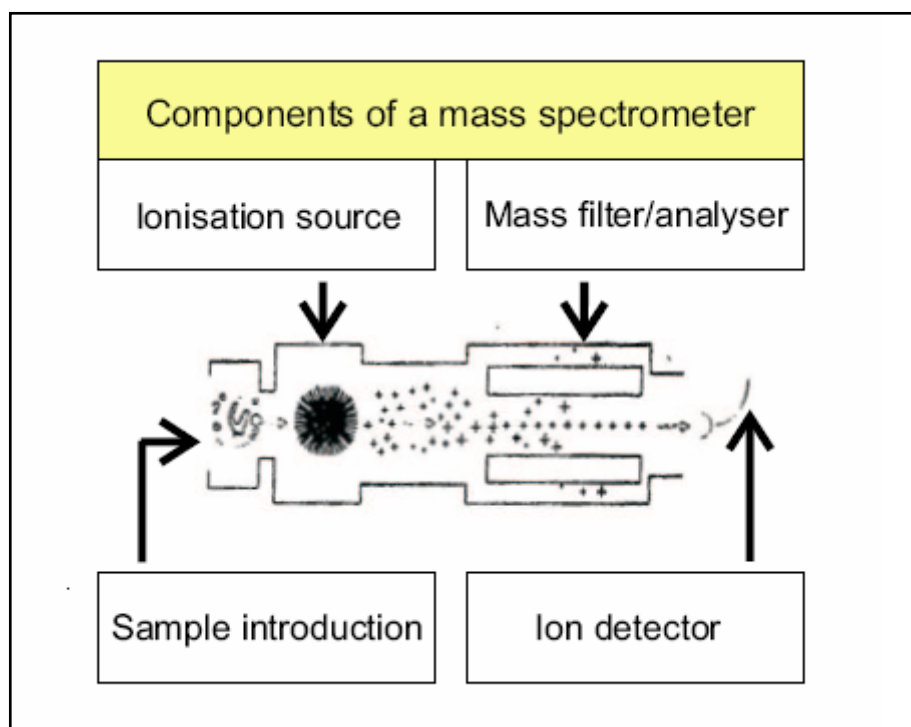


Fig. 9 Schema di uno spettrometro di massa

I componenti di base di uno spettrometro di massa sono il sistema di introduzione del campione, la fonte ionizzante, l'analizzatore/filtro di massa e il detector di ioni.

Segregazione di proteine ad ancora GPI.

Contrariamente ai domini di proteine transmembrana che attraversano tutta la membrana, le ancore GPI si inseriscono solo in un singolo strato. Questa caratteristica, insieme alle catene aciliche sature tipicamente trovate nella porzione lipidica delle GPI, assicurano l'associazione delle proteine GPI ancorate con i rafts lipidici. Nella maggior parte degli epiteli le proteine ad ancora GPI sono localizzate alla membrana apicale (Brown *et al.*, 1989; Lisanti *et al.*, 1989a) e sono associate a rafts durante il loro trasporto alla superficie (Brown and Rose, 1992). Per queste ragioni l'aggiunta dell'ancora, grazie alla sua capacità di promuovere l'associazione delle proteine con questi microdomini lipidici, è stato a lungo considerato come un segnale di localizzazione apicale in cellule polarizzate. A livello della membrana del TGN, i rafts agirebbero come una piattaforma di smistamento (Simons and van Meer, 1988; Simons and Ikonen, 1997). Recentemente, tuttavia, questa ipotesi è stata fortemente indebolita con la scoperta di alcune proteine ad ancora GPI smistate alla superficie basolaterale di cellule FRT (Zurzolo *et al.*, 1993) e di cellule MDCK (Benting *et al.*, 1999b; McGwire *et al.*, 1999; Sarnataro *et al.*, 2002; Paladino *et al.*, 2004). L'ancora GPI da sola non sempre è sufficiente a determinare lo smistamento apicale (Brown and London, 1998; Benting *et al.*, 1999b; McGwire *et al.*, 1999; Lipardi *et al.*, 2000; Sarnataro *et al.*, 2002; Paladino *et al.*, 2004) e fattori come la glicosilazione del dominio extracellulare delle proteine sembrano essere richiesti (Scheiffele *et al.*, 1995; Yeaman *et al.*, 1997; Brown and London, 1998; Gut *et al.*, 1998; Benting *et al.*, 1999b; Spodisberg *et al.*, 2001).

Un notevole avanzamento nella comprensione di come le proteine ad ancora GPI vengano smistate alla membrana plasmatica, si è avuto con il modello proposto da Paladino *et al.* secondo cui l'oligomerizzazione di proteine GPI ancorate apicali è il principale segnale di

smistamento apicale (Paladino *et al.*, 2004; Paladino *et al.*, 2006; Paladino *et al.*, 2007). In questo lavoro Paladino *et al.* hanno analizzato due proteine GPI apicalmente localizzate e due proteine GPI basolateralmente localizzate in cellule MDCK. Tutte le proteine risultano essere associate a rafts, ma solo le proteine GPI ancorate apicali e non quelle basolaterali, sono in grado di formare complessi ad alto peso molecolare (HMW, high molecular weight) a livello del Golgi. Mutazioni puntiformi nell'ectodominio proteico che impediscono l'oligomerizzazione risultano in una delocalizzazione delle proteine apicali al dominio basolaterale delle cellule. L'oligomerizzazione quindi sembra avvenire durante il trasporto alla membrana plasmatica concomitantemente all'associazione a rafts. Questi risultati ci hanno permesso di proporre un modello "multistep" per il "sorting" apicale di proteine GPI ancorate: a) grazie all'ancora GPI le proteine si associano con i rafts lipidici; b) l'oligomerizzazione delle proteine GPI ancorate apicali promuove la loro stabilizzazione nei rafts; c) l'oligomerizzazione induce la coalescenza dei piccoli rafts in un rafts più grande e funzionale che risulta nella gemmazione della vescicola apicale (Paladino *et al.*, 2004) (Fig. 10). Quali siano i fattori o i meccanismi per cui proteine GPI ancorate siano in grado di formare oligomeri, è tuttavia ignoto. Durante il mio dottorato mi sono dedicata allo studio dei fattori in grado di promuovere l'oligomerizzazione per cercare di chiarire questo meccanismo fondamentale per la polarizzazione cellulare.

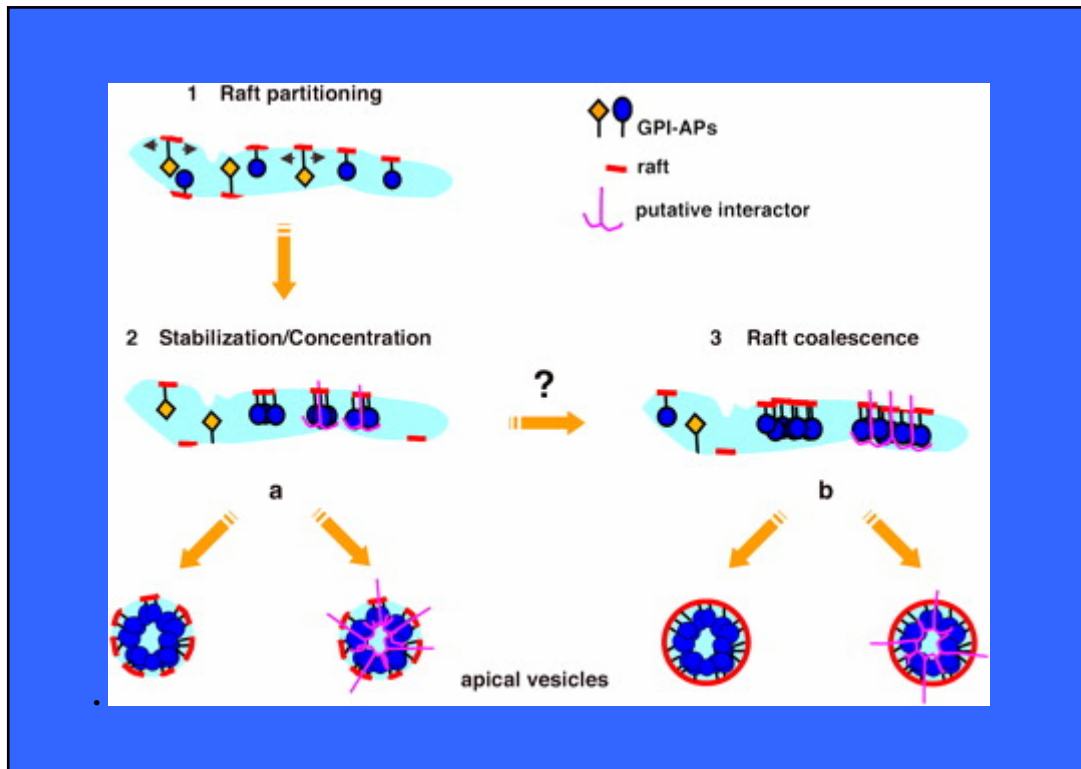


Fig . 10 Modello multistep per lo smistamento apicale di proteine ad ancora GPI

1. Proteine GPI apicali e basolaterali sono incluse nei rafts lipidici grazie all'affinità chimica dell'ancora per i rafts. 2. Solo le proteine GPI apicali sono stabilizzate nei rafts grazie all'oligomerizzazione proteica, aumentando la loro naturale affinità per i rafts. Un ipotetico recettore apicale potrebbe essere coinvolto in questo secondo step. 3. L'oligomerizzazione proteica porterebbe alla coalescenza di più rafts che risulterebbe nella formazione di un rafts funzionale più grande dal quale gemmerebbero vescicole apicali. Le vescicole apicali possono formarsi grazie a due meccanismi: a) l'oligomerizzazione/stabilizzazione nei rafts è sufficiente a dirigere lo smistamento apicale; b) l'oligomerizzazione stessa guida la coalescenza di più rafts e quindi la formazione delle vescicole apicali. (Da Paladino *et al.*, *JCB*, 2004).

Trasporto delle proteine ad ancora GPI.

In cellule MDCK le proteine apicali sono direttamente smistate alla membrana apicale dopo la loro uscita dal TGN (Brown *et al.*, 1989; Rodriguez-Boulán and Powell, 1992; Lipardi *et al.*, 1999). Questo modello accettato per molto tempo è stato recentemente messo in discussione da Polishchuk *et al.* che, grazie a complesse tecniche di imaging (microscopia confocale e videomicroscopia), mostrano che in cellule MDCK una proteina ad ancora GPI segue una via indiretta passando attraverso il polo basolaterale prima di dirigersi verso quello apicale (Polishchuk *et al.*, 2004). Questi risultati, inoltre, suggeriscono che lo smistamento delle proteine GPI apicali da quelle basolaterali avviene solo una volta raggiunto il polo basolaterale e quindi dopo la loro uscita dal TGN. Teoria in netta contraddizione con le ipotesi di Paladino *et al.* (Paladino *et al.*, 2004).

Durante il dottorato ho avuto la possibilità di collaborare allo studio del trasporto di proteine ad ancora GPI dal TGN alla membrana plasmatica in cellule polarizzate MDCK. Questo lavoro ha permesso di chiarire i risultati contraddittori ottenuti da Polishchuk e Paladino, utilizzando tecniche di imaging e di biochimica in grado di visualizzare il trasporto di proteine in cellule completamente polarizzate (Paladino *et al.*, 2006).

OBIETTIVI DEL LAVORO

DI TESI

OBIETTIVI DEL LAVORO DI TESI

Risultati del nostro laboratorio suggeriscono che promovendo l'assemblaggio e la stabilizzazione nei rafts lipidici, l'oligomerizzazione di proteine ad ancora GPI in complessi ad alto peso molecolare risulta essere un importante meccanismo per il loro smistamento apicale in cellule epiteliali polarizzate (Paladino *et al.*, 2004).

Una questione ancora aperta e dibattuta è capire da cosa dipende questa oligomerizzazione. Lo scopo del mio lavoro di tesi é stato analizzare diversi fattori potenzialmente coinvolti in questo meccanismo. Inoltre, durante il mio dottorato ho collaborato a un lavoro per chiarire il meccanismo di trasporto delle proteine GPI ancorate verso la superficie apicale.

Una volta formati, gli oligomeri formati da GPI-APs, diventano indipendenti dalla deplezione di colesterolo. Ciò suggerisce che i rafts lipidici rappresentino un ambiente favorevole che permette l'aggregazione delle proteine GPI, ma l'oligomerizzazione è piuttosto dipendente da un tipo di interazione proteina-proteina. Questo è il caso della proteina di fusione GFP-GPI in cui l'oligomerizzazione è mediata da ponti disolfuro dell'ectodominio della proteina (Paladino *et al.*, 2004). Tuttavia, nel caso di proteine GPI native, è più probabile che interazioni non covalenti tra gli ectodomini delle proteine siano coinvolti nella formazione degli oligomeri. Interazioni deboli, infatti, potrebbero essere formate e rotte più facilmente che interazioni covalenti, situazione che riflette in maniera più realistica la dinamicità della membrana plasmatica. Inoltre complessi HMW risultano sensibili al calore, rafforzando questa ipotesi.

Sia l'ectodominio che l'ancora GPI delle proteine potrebbero partecipare alle interazioni che determinano l'oligomerizzazione delle proteine GPI apicali. In particolare zuccheri presenti

sull'ectodominio proteico o differenze delle strutture delle ancore GPI potrebbero essere responsabili della formazione di tali interazioni. In aggiunta un fattore proteico esterno in grado di riconoscere una struttura nell'ectodominio o nell'ancora potrebbe intervenire.

In questo lavoro di tesi ho studiato queste tre possibilità analizzando il loro possibile ruolo nell'oligomerizzazione delle proteine ad ancora GPI nello smistamento alla superficie apicale di cellule epiteliali polarizzate. Specificamente ho analizzato:

1. il ruolo dei glicani nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI;
2. il ruolo dell'ancora GPI nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI;
3. la presenza di recettori apicali che possono mediare l'oligomerizzazione e lo smistamento apicale di proteine ad ancora GPI

1- Ruolo dei glicani nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI.

La prima osservazione che suggerisce che la glicosilazione possa avere un ruolo importante nel ripiegamento di una proteina e nell'oligomerizzazione è l'evidenza che questa modifica post-traduzionale avviene in parte nel Golgi dove si verifica lo smistamento (Hurtley and Helenius, 1989). Inoltre, sia la *N*- che la *O*-glicosilazione del dominio extracellulare delle proteine sono state implicate nello smistamento apicale in cellule epiteliali polarizzate (Rodriguez-Boulant and Gonzalez, 1999): *N*- e *O*-glicani agiscono come determinanti di smistamento apicale per alcune proteine secretorie (Scheiffele *et al.*, 1995) e per alcune

proteine di membrana (Yeaman *et al.*, 1997; Gut *et al.*, 1998; Benting *et al.*, 1999b; Potter *et al.*, 2004). La rimozione degli *N*- glicani da varie proteine apicali, mediante trattamento con tunicamicina o mutagenesi sito-diretta, porta alla secrezione non-polarizzata delle proteine (Urban *et al.*, 1987; Kitagawa *et al.*, 1994; Ihrke *et al.*, 2001; Martinez-Maza *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004). La delezione della regione *O*-glicosilata di p75^{NTR} e della saccarosio isomaltasi idrolasi risulta in un cambiamento della localizzazione finale di queste proteine (Yeaman *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 2000). L'*O*-glicosilazione sembra essere un fattore fondamentale per il corretto smistamento di molte altre proteine (Huet *et al.*, 1998; Naim *et al.*, 1999; Slimane *et al.*, 2000; Gouyer *et al.*, 2001) e anche nel lievito sono state trovate evidenze dell'importanza di questi zuccheri come determinanti di smistamento alla superficie cellulare (Proszynski *et al.*, 2004).

Tuttavia, un gruppo di proteine secretorie solubili indirizzate alla superficie apicale non mostra alcun effetto rispetto al suo smistamento polarizzato in seguito alla rimozione di *N*-glicani (Su *et al.*, 1999). Gli zuccheri non sembrano essere richiesti per la corretta localizzazione apicale dell'emagglutina del virus dell'influenza (Green *et al.*, 1981), per l'antigene di superficie dell'epatite B e per l'osteopontina in cellule MDCK (Marzolo *et al.*, 1997; Trischler *et al.*, 2001). Inoltre, la regione *O*-glicosilata è un componente necessario ma non sufficiente del segnale di smistamento apicale della saccarosio isomaltasi (Alfalah *et al.*, 1999). In questo caso, ad esempio, è richiesto anche un dominio di ancoraggio di membrana.

Il primo obiettivo di questo lavoro di tesi è stato chiarire il ruolo della glicosilazione nello smistamento apicale e nell'oligomerizzazione di proteine ad ancora GPI.

Per rispondere a questa domanda ho analizzato la localizzazione, l'associazione a rafts e la capacità di formare oligomeri di due proteine ad ancora GPI, una *N*-glicosilata e una *O*-

glicosilata, e dei loro mutanti di glicosilazione. In particolare ho studiato la versione GPI ancorata del recettore umano delle neurotrofine p75^{NTR} e la fosfatasi alcalina placentare (PLAP) in cellule MDCK.

2- Ruolo dell'ancora GPI nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI

La diversità strutturale dell'ancora GPI.

Le ancore GPI sono costruite su una porzione di fosfatidilinositolo che si inserisce nel foglietto esoplasmatico della membrana. All'inositolo è legato un gruppo di testa che contiene una glucosammina, tre residui di mannosio e una fosfoetanolammina che è unita con un legame ammidico al residuo C-terminale della proteina. In diversi tipi cellulari e in diverse specie questa struttura del gruppo di testa è modificata dall'addizione di altri residui di zuccheri e dall'acilazione del gruppo inositolo. La presenza di quest'ultima modifica rende l'ancora resistente all'azione della fosfolipasi C batterica PI-specifica. Una grande eterogeneità esiste all'interno della porzione lipidica dell'ancora GPI per la lunghezza della catena acilica. Fosfoetanolammine possono adornare il conservato core glucidico. Infine caratteristiche strutturali delle proteine stesse possono essere fonte di un'ulteriore livello di diversificazione (Ferguson, 1999).

La struttura finale dell'ancora GPI è controllata a livello cellulare (controllo primario) e a livello della struttura terziaria/quaternaria della proteina che trasporta l'ancora (controllo secondario). Per controllo primario si intende che il repertorio disponibile di strutture finali di GPI dipende dal livello di enzimi biosintetici presenti nella cellula, mentre il controllo

secondario definisce l'accessibilità delle strutture proteiche tridimensionali agli enzimi e quindi il sub-set del repertorio disponibile. Un esempio di controllo primario in *T.brucei* sono le differenze nelle catene laterali glucidiche e nelle strutture lipidiche quando VSG è espresso nel flusso sanguigno e nello stadio di insetto nel ciclo vitale del parassita (Paturiaux-Hanocq *et al.*, 1997). Un esempio di controllo secondario include differenze nella catena laterale di carboidrati di VSG quando VSGs con differenti sequenze C-terminali sono espresse nello stesso clone del tripanosoma (Zitzmann *et al.*, 2000).

Se differenti combinazioni di ancore e di strutture proteiche alterano l'affinità delle proteine per i rafts questo dovrebbe contribuire ad una ripartizione di varie proteine GPI ancorate in un distinto subset di rafts. Come abbiamo visto precedentemente non tutte le proteine ad ancora GPI sono smistate in maniera polarizzata all'apice delle cellule epiteliali. La nostra ipotesi è che ciò possa essere dovuto alla diversità strutturale delle ancore, che in base alla presenza/assenza di particolari sostituenti sul core dell'ancora stessa, favorirebbe la "clusterizzazione"/oligomerizzazione di proteine ad ancora GPI nei rafts lipidici e il conseguente smistamento su una superficie cellulare piuttosto che su un'altra.

Per rispondere a questo interrogativo ho analizzato la struttura (lipidi e carboidrati) di ancore di glicosilfosfatidilinositolo di una proteina di membrana secreta alla superficie apicale (PLAP) e di una secreta alla superficie basolaterale (la proteina prionica PrP) in due distinti tipi di cellule epiteliali polarizzate: cellule FRT e cellule MDCK. Le analisi dei lipidi e degli zuccheri delle diverse ancore GPI sono state ottenute mediante l'utilizzo di uno spettrometro di massa Q-STAR (vedi materiali e metodi).

Questo obiettivo è stato raggiunto in collaborazione con il Prof. Ferguson dell'Università di

Dundee, in Scozia, dove mi sono recata per alcuni mesi del mio dottorato.

3- Identificazione di fattori coinvolti nel processo di oligomerizzazione e smistamento apicale di proteine ad ancora GPI

Così come avviene per il coinvolgimento di proteine adattatrici nello smistamento basolaterale di proteine in cellule polarizzate, eventuali recettori apicali potrebbero riconoscere segnali di smistamento apicale e indirizzarli al corretto polo cellulare. Finora sono stati presi in considerazione una varietà di potenziali recettori. La proteina integrale vescicolare (VIP36), isolata da frazioni insolubili a detergenti (Fiedler and Simons, 1994), appartenente alla famiglia delle lectine, è presente nell'apparato del Golgi, sulla membrana plasmatica e in strutture endosomiali o vescicolari. Il ruolo di VIP36 come recettore apicale, tuttavia, è stato messo in discussione da studi che dimostrano il coinvolgimento di questa proteina nel traffico dall'ER al Golgi (Fullekrug *et al.*, 1999; Hara-Kuge *et al.*, 2002). Un altro candidato preso in questione è la proteina VIP17/MAL, richiesta per lo smistamento apicale di HA e altre proteine GPI (Cheong *et al.*, 1999; Puertollano *et al.*, 1999).

Recentemente un'altra classe di lectine, le galectine, hanno mostrato avere un ruolo importante nel traffico apicale. In particolare la galectina-4, una proteina di 36 kDa, interagisce con alta affinità con una variante specifica di glicosfingolipidi, i sulfatidi con lunghe catene idrossilate di acidi grassi, specificamente arricchiti nei rafts lipidici delle cellule HT-29. La deplezione mediante RNA interference della galectina-4 impedisce la formazione dei rafts e disturba il traffico apicale (Delacour *et al.*, 2005). Questi dati suggeriscono che l'interazione tra la galectina-4 e i sulfatidi è importante nell'organizzazione dei rafts lipidici per un efficiente traffico apicale.

Ulteriori studi, tuttavia, sono necessari per chiarire il ruolo di questi recettori nel mantenimento della polarità cellulare, per un'identificazione certa di un eventuale recettore e soprattutto per chiarire come questi recettori possano interagire con le proteine e /o quali determinanti di smistamento possano riconoscere.

Un obiettivo che mi sono posta nel mio lavoro di dottorato è stato appunto quello di identificare in maniera chiara, mediante metodiche di spettrometria di massa, un eventuale recettore proteico che possa mediare l'oligomerizzazione di proteine apicali ad ancora GPI e quindi il loro corretto smistamento sulla superficie cellulare in cellule FRT.

RISULTATI SPERIMENTALI

Sommario:

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato studiare meccanismi che promuovono l'oligomerizzazione delle proteine ad ancora GPI durante il loro smistamento apicale in cellule epiteliali polarizzate. Quest'analisi è stata articolata in tre punti, presentati qui come risultati 2, 3 e 4. Nel paragrafo 1 dei risultati è presentato un lavoro sulle analisi del meccanismo di trasporto delle proteine GPI ancorate a cui ho collaborato.

Risultati 1: Analisi della via di trasporto apicale delle proteine ad ancora GPI.

Durante il mio dottorato ho partecipato allo studio del trasporto di proteine ad ancora GPI dal TGN alla membrana plasmatica in cellule MDCK. Abbiamo dimostrato che le proteine GPI seguono una via di smistamento diretta dal TGN per raggiungere la membrana plasmatica e non la via indiretta o di transitosi. Questo lavoro è stato pubblicato su "*The Journal of Cell Biology*" nel 2006.

Risultati 2: Ruolo della glicosilazione nello smistamento apicale e nell'oligomerizzazione di proteine GPI ancorate.

Legami non-covalenti tra le catene glicidiche presenti sull'ectodominio delle proteine possono guidare l'associazione delle proteine in complessi ad alto peso molecolare. Lo studio del ruolo della glicosilazione nell'oligomerizzazione e nella localizzazione apicale delle proteine ad ancora GPI è risultato in un lavoro sottomesso a *Traffic*. In quest'articolo ho dimostrato che la glicosilazione ha solo un ruolo indiretto nel meccanismo di smistamento apicale delle proteine

GPI ancorate.

Risultati 3: Ruolo dell'ancora GPI nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI: analisi strutturale.

Analisi strutturali sono state condotte sull'ancora GPI della proteina apicale PLAP e della proteina basolaterale PrP^c in cellule MDCK e FRT per evidenziare eventuali differenze molecolari che potrebbero essere responsabili di un differente smistamento delle due proteine e dell'oligomerizzazione di quelle GPI ancorate apicali. I risultati che ho ottenuto finora escludono una differenza strutturale tra le ancore di proteine apicali e basolaterali. Questo lavoro è in fase di stesura.

Risultati 4: Identificazione di fattori coinvolti nel processo di oligomerizzazione e smistamento apicale di proteine ad ancora GPI.

Infine durante il mio dottorato ho ottenuto dei risultati tuttavia ancora preliminari sull'identificazione e caratterizzazione di interattori proteici che possano promuovere l'oligomerizzazione delle proteine GPI ancorate apicali e favorire il loro smistamento apicale.

RISULTATI SPERIMENTALI

1- Analisi della via di trasporto apicale delle proteine ad ancora GPI

I risultati di questo studio sono riassunti in questa sezione dei risultati e descritti nel lavoro pubblicato annesso alla tesi.

Problematica

La polarità è una delle proprietà più importanti degli epiteli. Essa consiste nella formazione di due domini di membrana morfologicamente e funzionalmente distinti: il dominio apicale e il dominio basolaterale. La distribuzione asimmetrica di superficie delle proteine e dei lipidi per la generazione di questi due domini è ottenuta grazie alla presenza di uno smistamento selettivo e continuo verso la membrana apicale e basolaterale (Mellman, 1996; Matter, 2000).

Macchinari di smistamento apicali e basolaterali riconoscono specifici segnali di “sorting” sulle proteine permettendo la loro incorporazione in vescicole di smistamento apicali o basolaterali (Wandinger-Ness *et al.*, 1990; Mostov *et al.*, 2000; Keller *et al.*, 2001; Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005).

Le vescicole di smistamento possono raggiungere la membrana apicale o basolaterale attraverso due vie: una via diretta dal sito di smistamento (TGN) alla membrana plasmatica e una via indiretta, o transcitosi, che consiste nel passare prima da una superficie, più comunemente quella basolaterale, da cui le proteine sono endocitate per raggiungere attraverso nuove vescicole il compartimento in cui trovano la loro ultima localizzazione (Rodriguez-Boulan and Powell, 1992; Mostov *et al.*, 2000). L'utilizzo preferenziale di una via

piuttosto che dell'altra sembra essere specifica di un tipo cellulare e ognuna di queste vie è regolata da segnali di smistamento più o meno noti (Rodriguez-Boulau *et al.*, 2005). Nelle cellule di fegato la via indiretta è quella preferita, mentre in cellule intestinali (Caco2) le due vie coesistono. Nelle cellule epiteliali (MDCK e FRT) sembrerebbe che la via indiretta sia riservata solo ad alcune proteine basolaterali.

I segnali di smistamento basolaterali sono relativamente ben conosciuti, mentre per quelli apicali la situazione è più complessa e non ben definita. Le proteine ad ancora GPI costituiscono un buon modello di studio dei segnali apicali. È stato dimostrato che esse sono segregate dalle proteine basolaterali a livello del TGN (Keller *et al.*, 2001) grazie alla loro incorporazione in rafts lipidici (Brown, 1992; Simons and Ikonen, 1997). Inoltre nel nostro laboratorio è stato dimostrato che l'incorporazione nei rafts non è sufficiente a permettere il corretto smistamento apicale delle proteine ad ancora GPI. Affinchè le proteine GPI apicali siano incorporate nelle corrette vescicole e quindi localizzate al corretto dominio di membrana, queste devono essere in grado di oligomerizzare in complessi ad alto peso molecolare (Paladino *et al.*, 2004).

Mediante studi di “pulse and chase” abbiamo dimostrato che l'incorporazione in rafts e l'oligomerizzazione avvengono contemporaneamente mentre la proteina transita a livello del Golgi. Questi risultati quindi supportano l'ipotesi che lo smistamento delle proteine ad ancora GPI avviene a livello del TGN e quindi prima dell'arrivo alla membrana apicale. Studi biochimici avevano già proposto questo meccanismo di smistamento diretto per le proteine GPI ancorate apicali (Arreaza and Brown, 1995; Lipardi *et al.*, 2000). Tuttavia un articolo recente ha messo in discussione l'utilizzo della via diretta per le proteine GPI apicali (Polishchuk *et al.*, 2004). Gli autori hanno mostrato attraverso tecniche di videomicroscopia

che una proteina ad ancora GPI era trasportata alla membrana apicale mediante transitosi, suggerendo quindi che lo smistamento delle proteine ad ancora GPI si effettua solo dopo il loro arrivo alla membrana.

Tuttavia, in questo lavoro sono state usate varie condizioni sperimentali (in particolare l'utilizzo di trasfezioni in transiente) che rendono difficili gli esperimenti biochimici e le cellule utilizzate per gli esperimenti di videomicroscopia, a nostro avviso, non erano completamente polarizzate. Dopo aver messo a punto una tecnica in grado di superare questi ostacoli e che permettesse di analizzare per la prima volta mediante microscopia cellule epiteliali completamente polarizzate, avvalendoci anche di studi biochimici, abbiamo dimostrato che le proteine ad ancora GPI sono smistate direttamente dal TGN alla membrana plasmatica. I nostri dati quindi riconfermano che lo smistamento avviene intracellularmente e non dopo l'arrivo delle proteine alla membrana plasmatica e che le proteine seguono una via di trasporto diretta alla membrana apicale.

Risultati

In questo lavoro abbiamo caratterizzato la via di trasporto utilizzata da proteine ad ancora GPI per raggiungere la superficie apicale di cellule epiteliali MDCK, combinando studi biochimici con una nuova metodica di "imaging" su cellule in vivo completamente polarizzate. In particolare, utilizzando delle biotiniziazioni selettive di superficie accoppiate a marcatura delle proteine con amminoacidi radioattivi tipo "pulse and chase" su cellule completamente polarizzate su filtro, abbiamo mostrato che tre proteine ad ancora GPI, nuovamente sintetizzate, arrivano progressivamente alla membrana apicale senza passare attraverso la membrana basolaterale. In queste condizioni non abbiamo mai osservato l'accumulo alla superficie basolaterale prima dell'arrivo alla superficie apicale come ci si aspetterebbe nel

caso in cui le proteine arrivassero prima alla superficie basolaterale e quindi seguissero un trasporto indiretto. Questi risultati sono stati confermati anche mostrando che sia digerendo le proteine della superficie basolaterale con tripsina, sia bloccando l'endocitosi e l'esocitosi a livello della membrana basolaterale, in alcun caso, l'indirizzamento delle proteine alla membrana apicale viene impedito, confermando anche il suo carattere diretto. Abbiamo inoltre confermato questi risultati utilizzando una tecnica di microscopia confocale basata sulla metodica dello spinning-disk. Questo é un tipo di confocale che offre un'alta risoluzione, alta velocità di acquisizione e ridotto sbiancamento del campione. In questo modo siamo riusciti a seguire l'arrivo di una proteina modello GFP-GPI, che è fluorescente perchè legata al GFP, dal Golgi alla membrana plasmatica apicale di cellule completamente polarizzate su filtro. Finora cio' non era realizzabile a causa dello spessore dello strato delle cellule polarizzate (10-15 microns) e alla lentezza e alla mancanza di sensibilità dei sistemi di "imaging" commerciali.

I nostri risultati mostrano, mediante tecniche biochimiche e di microscopia d'avanguardia, che le proteine ad ancora GPI sono smistate direttamente dal TGN alla membrana plasmatica apicale, suggerendo così che il loro smistamento avviene intracellularmente, verosimilmente a livello del TGN.

Conclusioni

Lo smistamento delle proteine ad ancora GPI dipende dalla loro associazione a rafts concomitantemente alla loro oligomerizzazione in complessi ad alto peso molecolare che avviene durante il passaggio delle proteine nell'apparato del Golgi, supportando la possibilità che lo smistamento delle altre proteine in vescicole secretorie avvenga a livello del TGN (Paladino *et al.*, 2004). In questo lavoro, grazie a nuove metodiche di "imaging" e alla

messa a punto di un sistema di “pulse and chase” della fluorescenza in cellule vive polarizzate in cui la proteina veniva bloccata nel TGN attraverso un blocco di temperatura (20°C) e poi rilasciata verso la superficie a 37°C, abbiamo potuto dimostrare che la segregazione tra una proteina GPI apicale e una basolaterale avviene nel Golgi. Dopo dieci minuti dal rilascio del blocco di temperatura e passaggio a 37°C, le due proteine appaiono in strutture differenti, possibilmente vescicole di smistamento apicali e basolaterali. Inoltre con questa tecnica abbiamo anche potuto seguire il segnale fluorescente di GFP-GPI lasciare il TGN e arrivare direttamente alla superficie apicale senza passare per stazioni intermedie.

Questi dati dimostrano fortemente uno smistamento intracellulare delle proteine ad ancora GPI, verosimilmente a livello del TGN, e un trasporto alla membrana plasmatica apicale attraverso la via diretta. Resta ancora da stabilire quali siano i meccanismi di questo trasporto. A parte alcuni elementi del citoscheletro sul quale necessariamente le vescicole si spostano, sono disponibili solo poche informazioni circa le componenti molecolari che intervengono in questo evento.

Una volta evidenziata la via di trasporto restano ancora da chiarire come avvenga il “budding” delle vescicole, quali siano i meccanismi (motori, citoscheletro) che intervengono nel trasporto delle vescicole e che cosa determina la specificità della fusione con la membrana apicale. Un passo avanti è stato fatto recentemente dal nostro laboratorio in cui abbiamo dimostrato che la specificità della fusione delle vescicole contenenti le proteine GPI-APs dipende dal sistema v- t- SNARE (TiVAMP/Syntaxin3) come nel caso delle proteine transmembrana che seguono la via diretta. Per le proteine apicali che seguono la via indiretta, invece, interviene una t- SNARE diversa (VAMP8) (Pocard *et al.*, 2007). Tuttavia altri studi sono necessari per rispondere pienamente a questi quesiti.

LAVORO n. 1:

“GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells.”

Paladino S, Pocard T, Catino MA, Zurzolo C. *J Cell Biol.*, 2006.

GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells

Simona Paladino,^{1,2} Thomas Pocard,² Maria Agata Catino,^{1,2} and Chiara Zurzolo^{1,2}

¹Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, CEINGE Biotecnologie Avanzate, Università degli Studi di Napoli Federico II, 80131 Napoli, Italy

²Unité de Trafic Membranaire et Pathogénèse, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France

The polarity of epithelial cells is dependent on their ability to target proteins and lipids in a directional fashion. The trans-Golgi network, the endosomal compartment, and the plasma membrane act as sorting stations for proteins and lipids. The site of intracellular sorting and pathways used for the apical delivery of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins (GPI-APs) are largely unclear. Using biochemical assays and confocal and video microscopy in living cells, we show that newly synthesized GPI-APs are directly deliv-

ered to the apical surface of fully polarized Madin–Darby canine kidney cells. Impairment of basolateral membrane fusion by treatment with tannic acid does not affect the direct apical delivery of GPI-APs, but it does affect the organization of tight junctions and the integrity of the monolayer. Our data clearly demonstrate that GPI-APs are directly sorted to the apical surface without passing through the basolateral membrane. They also reinforce the hypothesis that apical sorting of GPI-APs occurs intracellularly before arrival at the plasma membrane.

Introduction

The plasma membrane of polarized epithelial cells is divided by tight junctions into apical and basolateral domains, which display different protein and lipid compositions that are required for a range of specialized functions. This asymmetric distribution is achieved by continuous sorting of newly synthesized components and their regulated internalization (Mellman, 1996; Matter, 2000). Evidence derived from biochemical and live imaging studies have shown that apical and basolateral membranes segregate into different vesicles upon exit from the TGN (Griffiths and Simons, 1986; Wandinger-Ness et al., 1990; Keller et al., 2001; Kreitzer et al., 2003), supporting the hypothesis that the TGN is the major sorting station during exocytosis of newly synthesized proteins. More recent work has shown that protein sorting could also occur in recycling endosomes (REs) after their exit from the TGN (Folsch et al., 2003; Ang et al., 2004), similar to what happens in yeast (Luo and Chang, 2000).

Intracellular sorting of newly synthesized proteins at the TGN or in REs is based upon recognition by the sorting machinery of specific apical and basolateral sorting signals (Mostov et al., 2000) that mediate their incorporation into apical and basolateral sorting vesicles (Wandinger-Ness et al., 1990;

Keller et al., 2001; Rodriguez-Boulán et al., 2005). As a result of these events, proteins can be transported to the surface after either a direct or an indirect (transcytotic) route that first passes through the opposite membrane domain. Utilization of the direct or indirect pathways seems to be both cell and protein specific (Rodriguez-Boulán et al., 2005). For example, in liver cells, the majority of proteins follow an indirect pathway, whereas in Caco-2 intestinal cells, both pathways are used, and the choice is likely to be protein specific. In MDCK (kidney) and FRT (Fischer rat thyroid) cells, the direct pathway is more commonly used, whereas the transcytotic pathway seems to be more specific for basolateral proteins and transmembrane receptors (Mostov et al., 1986; Sarnataro et al., 2000), where specific signals for this route have been found (Casanova et al., 1990; Apodaca and Mostov, 1993; Song et al., 1994). In these cells, apical proteins mainly use a direct pathway (Rodriguez-Boulán et al., 2005), and the indirect pathway has been shown mainly during the establishment of the polarized epithelium (Zurzolo et al., 1992; Rodriguez-Boulán et al., 2005).

Basolateral sorting is mediated by discrete domains in the cytosolic protein tail frequently containing tyrosine or dileucine motifs (Bonifacino and Traub, 2003), which are recognized by the clathrin adaptor complex (Folsch et al., 1999; Sugimoto et al., 2002). However, the situation is more complicated for apical proteins because lumen-localized domains, transmembrane domains, and membrane-binding features have all been shown to be important for apical sorting (Scheiffele et al., 1995, 1997;

Correspondence to Chiara Zurzolo: zurzolo@pasteur.fr; zurzolo@unina.it

Abbreviations used in this paper: GPI, glycosylphosphatidylinositol; GPI-AP, GPI-anchored protein; NTR, neurotrophin receptor; PATJ, Pals1-associated tight junction protein; PLAP, placental alkaline phosphatase; RE, recycling endosome; TER, transepithelial resistance.

The online version of this article contains supplemental material.

Chuang and Sung, 1998; Sun et al., 1998; Lipardi et al., 2000). A case in point are the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins (GPI-APs) that have been shown to be directly targeted to the apical domain after lateral segregation from basolateral cargo in the TGN (Keller et al., 2001) because of their incorporation into sphingolipid- and cholesterol-rich microdomains (rafts), which were assayed by their insolubility in cold detergents (Brown and Rose, 1992; Simons and Ikonen, 1997). However, it was recently demonstrated that association with detergent-resistant microdomains is not sufficient to determine apical sorting of GPI-APs but that stabilization into rafts, promoted by their oligomerization (which most likely leads to the coalescence of more rafts), is required (Paladino et al., 2004). It was also found that oligomerization of GPI-APs begins in the medial Golgi and is concomitant with association in detergent-resistant microdomains. Therefore, this data suggest that sorting of apical GPI-APs occurs during passage through the Golgi apparatus, presumably at the TGN and before reaching the plasma membrane. This hypothesis has been supported by several biochemical experiments showing that after their segregation at the TGN, GPI-APs are directly delivered from the Golgi to the apical plasma membrane (Arreaza and Brown, 1995; Lipardi et al., 2000).

The aforementioned model has been challenged recently by Polishchuk et al. (2004), who, by using state of the art technologies for imaging in living cells, have shown that a GPI-linked protein (GFP-GPI) was apically targeted after a transcytotic route, thus suggesting that apical sorting of GPI-APs occurs after membrane delivery. However, the experiments showing either direct or indirect sorting of GPI-APs in living cells have been performed in conditions that were not fully polarized because of the difficulty of imaging polarized cells growing on a filter in three dimensions and in transiently transfected cells where biochemical experiments are difficult to perform. Therefore, to understand the routing and sorting site of GPI-APs, we directly followed the sorting and trafficking of three different GPI-APs to the apical surface of stably transfected clones of MDCK cells by using both biochemical and live imaging approaches in fully polarized cells. We demonstrate that all proteins are directly delivered to the apical surface and that the impairment of basolateral fusion/endocytosis does not affect apical transport, thus suggesting that sorting occurs intracellularly before reaching the plasma membrane.

Results

Newly synthesized GPI-APs are directly targeted to the apical surface in fully polarized monolayers

The mechanism of sorting and the route that GPI-APs follow to reach the apical membrane are still debated. We have recently shown that both raft association and protein oligomerization are required for apical sorting of GPI-APs. These two events occur concomitantly in the Golgi apparatus, suggesting that the sorting of GPI-APs occurs in the Golgi (Paladino et al., 2004). In direct contrast to these data, a recent study using live imaging techniques showed that a chimeric GPI protein (GFP-GPI) is

apically targeted by a transcytotic pathway in MDCK cells (Polishchuk et al., 2004).

We decided to directly investigate the pathway and the sorting site of GPI-APs by using both biochemical and imaging approaches and three different GPI model proteins stably transfected in MDCK cells: GFP-GPI, encoded by the same cDNA used in the live study of Polishchuk et al. (2004); placental alkaline phosphatase (PLAP), a native GPI-AP; and neurotrophin receptor (NTR)-PLAP, in which the ectodomain of p75^{NTR} is fused to the GPI attachment signal of PLAP (Monlauzeur et al., 1998; Lipardi et al., 2000). To analyze the pathway followed by the newly synthesized GPI-APs, we performed a biotin-targeting assay (Zurzolo et al., 1992). Fully polarized MDCK cells grown on filters for 4 d were pulse labeled with [³⁵S]methionine for 15 min and chased for the indicated times (Fig. 1 A). At each chase time, biotin was added to the apical or basolateral surface to catch the arrival of the protein at the plasma membrane. After 15 min of chase, GFP-GPI was detected on the apical surface, and it progressively accumulated on this domain, whereas very low amounts also accumulated with similar kinetics on the basolateral plasma membrane (Fig. 1 A). These results suggest that GFP-GPI follows a direct route to reach the apical surface and that small amounts of the protein are missorted to the basolateral domain.

To rule out the possibility that this behavior was specific for GFP-GPI, we performed the same experiment using PLAP. Newly synthesized PLAP was initially detected on the apical surface after 60 min of chase and accumulated there for up to 2 h (Fig. 1 A). A small amount of the protein was missorted to the basolateral domain at all chase times, as was found for GFP-GPI, indicating that PLAP also followed a direct apical route. Similar results were obtained with NTR-PLAP in 4-d-old monolayers (Fig. S1 A, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>).

It was previously shown that during the establishment of a polarized monolayer in filter culture, apical proteins that are normally sorted via a direct route can use the transcytotic pathway (Zurzolo et al., 1992). Because of this, we repeated the same targeting assay in MDCK cells grown on filter for just 1.5 d (Fig. 1 B). Also in these conditions, we found that both GFP-GPI and PLAP were directly targeted to the apical surface, although a higher amount of both proteins was missorted to the basolateral surface in comparison with the fully polarized 4-d-old cultures. Interestingly, in one case, we found that a small amount of GFP-GPI accumulated on the basolateral surface before reaching the apical membrane (Fig. S1 B), which is a classic behavior for a transcytotic protein. Thus, to establish the influence of time in culture for the initial establishment of the apical delivery of GFP-GPI, we repeated the targeting assays after 1, 2.5, and 4 d in culture. By quantifying different experiments, we could show that the basolateral delivery of GFP-GPI observed after 1 d of culture progressively disappeared over several days (Fig. 1 C) and that the apical polarity of GFP-GPI increased from 50% on the first day to 80% on the fourth day of culture (Fig. 1 C). These results confirmed our previous findings that an indirect route could be used during the establishment of a polarized monolayer to salvage missorted proteins and

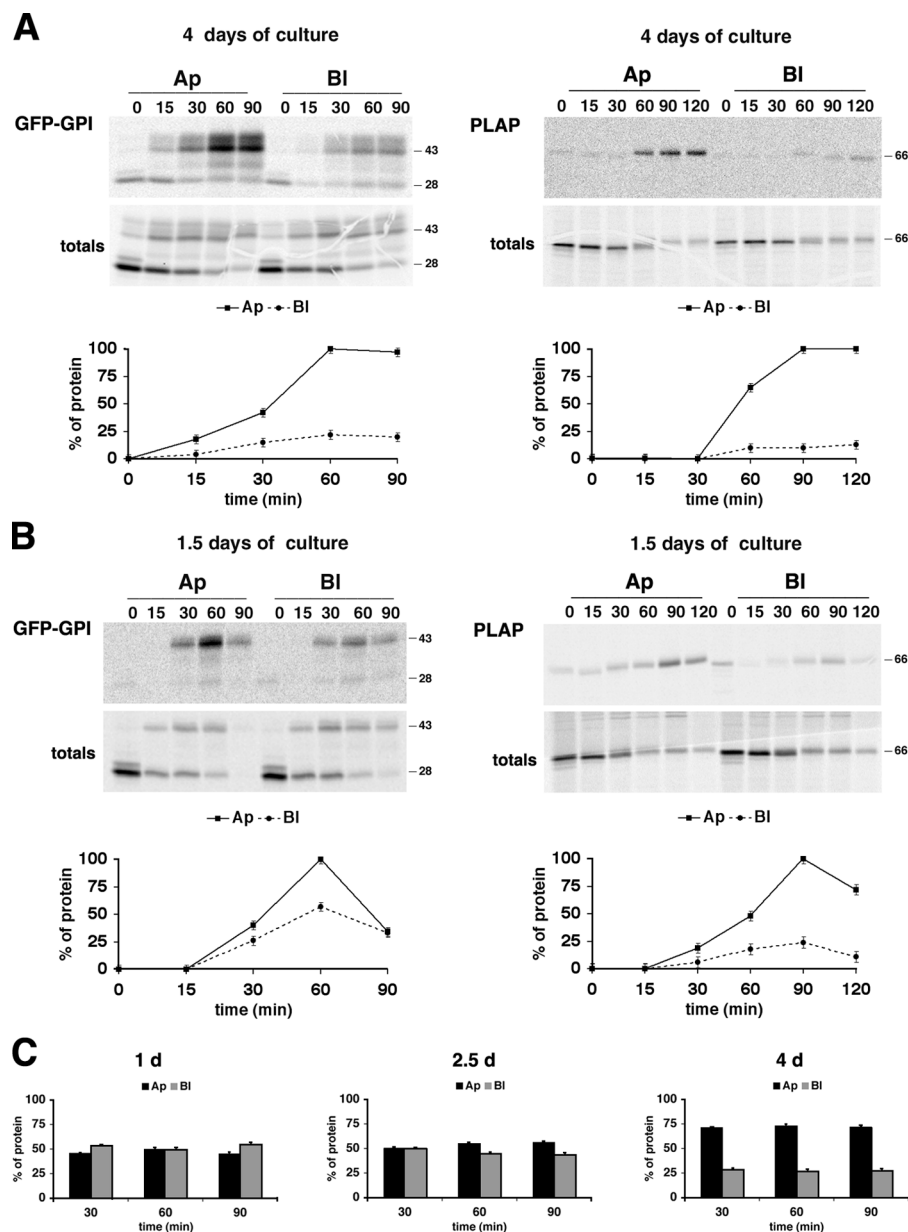


Figure 1. Newly synthesized GPI-APs are directly targeted to the apical surface. MDCK cells stably expressing GFP-GPI or PLAP grown on filters for 4 (A) or 1.5 d (B) were pulsed for 15 min with [35 S]methionine and chased for the indicated times. At the end of each chase time, cells were labeled with LC-biotin and added to the apical (Ap) or basolateral (Bl) surface, respectively. Cell lysates were immunoprecipitated with specific antibodies. The biotinylated proteins were recovered from the immunoprecipitates by reprecipitation with streptavidin beads. After running on SDS-PAGE, samples were analyzed by phosphorimager. One tenth of immunoprecipitates (totals) was kept before streptavidin precipitation and shown in the bottom panels. The monomer form of GFP-GPI (28 kD) and the slower mobility band (43 kD), a partially denatured GFP dimer that was previously described (Inouye and Tsuji, 1994; Paladino et al., 2004), are indicated. Fluorograms of four different experiments were quantified, and the results were expressed as a percentage of the amount at the time of maximal surface expression. For GFP-GPI, the quantification is referred to as the upper and lower bands together. (C) MDCK cells stably expressing GFP-GPI grown on filters for 1, 2.5, and 4 d were pulsed for 15 min with [35 S]methionine, chased for 30, 60, and 90 min, and processed as in A and B. Results from four different experiments were plotted as percent apical and basolateral surface expression. Error bars represent SD.

reestablish the correct polarity (Zurzolo et al., 1992). This behavior appears to be protein specific (Rodriguez-Boulant et al., 2005) because it was observed for GFP-GPI and NTR-PLAP (Fig. S1, A and B) but never for PLAP.

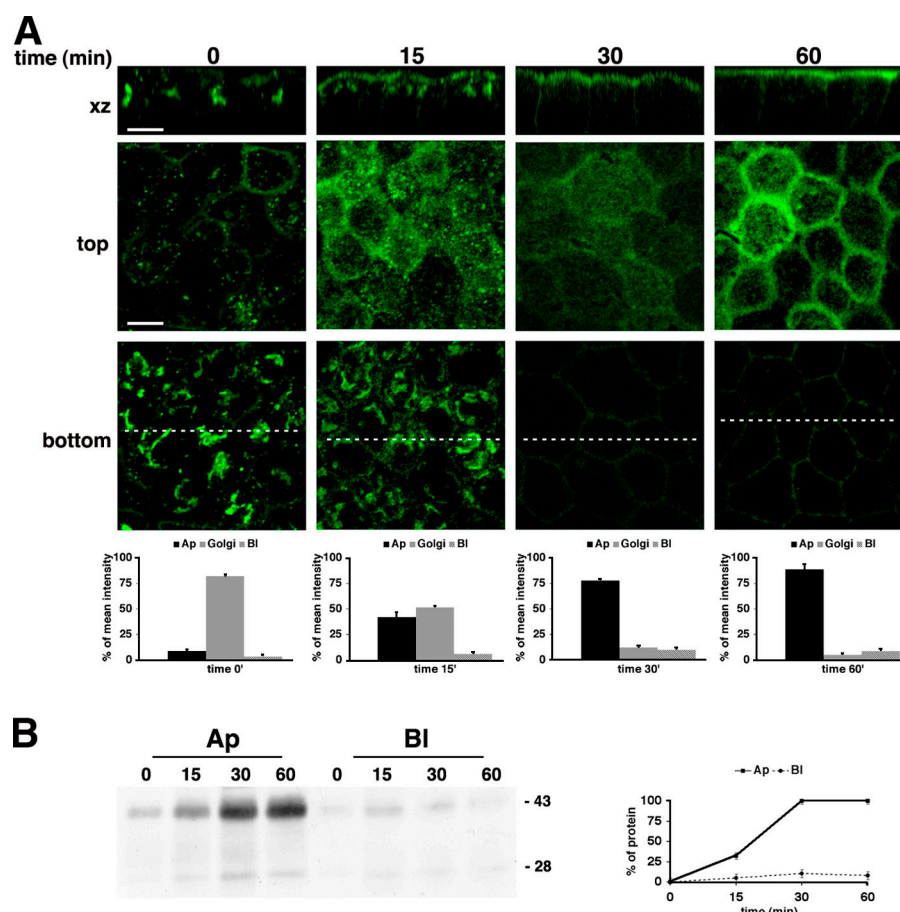
GFP-GPI accumulated in the Golgi is also targeted directly to the apical surface

The biotin-targeting assay analyzes only newly synthesized proteins. Because it has been shown that GPI-APs can recycle intracellularly through the Golgi apparatus (Nichols et al., 2001), it is possible that the newly synthesized and recycled proteins follow different pathways and that their sorting sites are, therefore, different. To analyze exclusively the targeting of GPI-APs from the Golgi apparatus, we set up a cold targeting assay using a Golgi temperature block combined with protease digestion.

To eliminate the protein already present on the plasma membrane, 25 μ g/ml trypsin was added for 1 h to the apical and basolateral sides of filter-grown MDCK cells expressing GFP-GPI. This treatment was able to remove almost all GFP-GPI present at steady state on the surface (Fig. S2, A and B; available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>). Conversely, by confocal microscopy, we did not detect any GFP signal on the surface to which the enzyme was added (Fig. S2 A). By Western blotting, we found the protein only in the media of trypsin-treated cells (Fig. S2 B), thus indicating that trypsin does not pass through the monolayer but digests only the proteins present on the side exposed to it (Fig. S2, A and B).

After clearing the surface by trypsin treatment, fully polarized monolayers were subjected to a temperature block by incubation at 19.5°C in the presence of cycloheximide to accumulate the protein in the Golgi and to eliminate newly

Figure 2. GFP-GPI is directly delivered from the Golgi to the apical surface. MDCK cells stably expressing GFP-GPI grown on filter for 4 d were incubated with trypsin to eliminate all proteins at the surface and were subjected to a temperature block to accumulate proteins in the TGN (see Materials and methods). Cells were then warmed at 37°C for the indicated times in culture medium containing cycloheximide. After each time point, cells were fixed and treated for confocal microscopy where serial confocal sections were collected from the top to the bottom of the cell monolayer (A). The dashed lines show the positions from where the xz sections were taken. Mean fluorescence intensities at the Golgi, apical, and basolateral domains were measured at the different chase times and expressed as percentages of total fluorescence (A, bottom; see Materials and methods). Alternatively, cells were biotinylated from the apical (Ap) or basolateral (Bl) side. After lysis, GFP-GPI was immunoprecipitated with an antibody against GFP and revealed by using HRP-streptavidin (B). Gels from three different experiments were quantified, and the results were expressed as percentages of the amount at the time of maximal surface expression. The amount of protein still present at the apical or basolateral surface at time = 0 was subtracted from all chase times. Error bars represent SD. Bars, 10 μ m.



synthesized proteins. Cells were then warmed at 37°C for the different indicated times in the presence of cycloheximide, and the arrival of proteins at the cell surface was assayed both by confocal microscopy (Fig. 2 A) and by domain-selective biotinylation at different chase times (Fig. 2 B). For microscopy, cells were fixed and imaged by collecting z axis stacks to visualize all of the protein inside the cells. Xz reconstructions are shown for different times in Fig. 2 A. At time = 0, GFP-GPI was present almost exclusively in the Golgi apparatus, as was previously demonstrated (Keller et al., 2001; Paladino et al., 2004; Polishchuk et al., 2004). The ring sometimes observed at the top of the cells at time = 0 in the xy section (also see Figs. 5 and 7) represents the edge of the apical surface, possibly as a result of incomplete trypsin digestion. During the chase times, GFP-GPI progressively accumulated on the apical surface, as clearly shown both in xz microscopy sections and in xy sections collected from the top of the cells as well as by quantification of the fluorescent signal in selected regions from a single z plane at different heights through the cell (Fig. 2 A). Consistent with the confocal data, we found by surface biotinylation that after 15 min at 37°C, GFP-GPI began to arrive at the apical surface and accumulated there for up to 60 min (Fig. 2 B). Thus, both these approaches confirmed that GFP-GPI previously accumulated in the Golgi is directly targeted to the apical surface.

Exposure of the basolateral membrane to tannic acid or trypsin does not affect the apical arrival of GFP-GPI

To rule out the possibility that we were missing a fast passage of proteins through the basolateral surface, we used two approaches. In one, we added trypsin to the basolateral surface to remove any protein that was passing through the basolateral domain, and, in the other, we inhibited basolateral traffic using tannic acid as previously described (Polishchuk et al., 2004).

In the first approach, to detect proteins passing through the basolateral surface, we adapted an assay that was used before to demonstrate transcytosis of the polymeric Ig receptor in MDCK cells (Casanova et al., 1990). We added 25 μ g/ml trypsin to the basolateral medium during the chase time course at 37°C after the temperature block so that the molecules passing through the basolateral surface would be proteolysed and should not be recovered at the apical surface. To the contrary, molecules directly delivered to the apical surface would not be exposed to trypsin and would be detected normally. In the presence of trypsin, GFP-GPI was still apically delivered to the same extent as in untreated cells (Fig. 3), and only the portion of protein that was missorted to the basolateral surface was recovered in the basolateral media as a faster migrating, partially digested form (Fig. 3). It is to be expected that the β barrel of GFP will be more resistant to enzymatic activity, whereas the loops outside the barrel would be digested. On the other hand,

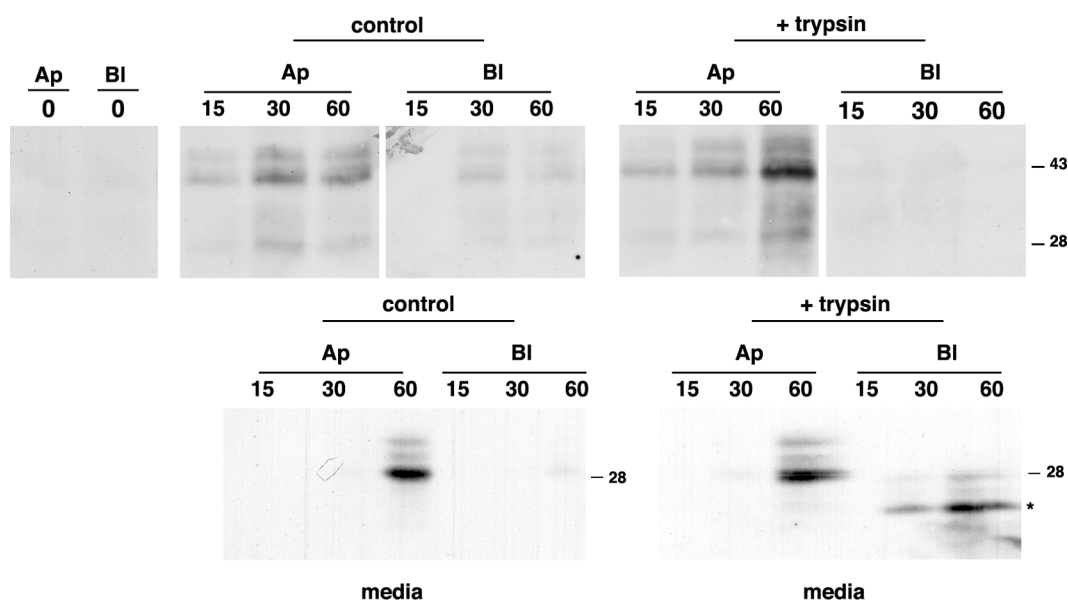


Figure 3. GFP-GPI still reaches the apical surface in the presence of trypsin in the basolateral medium. MDCK cells stably expressing GFP-GPI grown on filter for 4 d were incubated with trypsin, subjected to a temperature block in the TGN (see Materials and methods), and chased at 37°C for the indicated times (in minutes) in the presence or absence of 25 μ g/ml trypsin in the basolateral media. After each chase time, cells were selectively biotinylated from the apical (Ap) or basolateral (Bl) surface. After immunoprecipitation with an antibody against GFP, samples were run on SDS-PAGE and revealed using HRP-streptavidin. Apical and basolateral media for control and treated cells were recovered at all chase times, proteins were TCA precipitated, run on SDS-PAGE, and revealed by Western blotting using GFP antibody. The asterisk indicates the trypsin partially digested form of GFP-GPI.

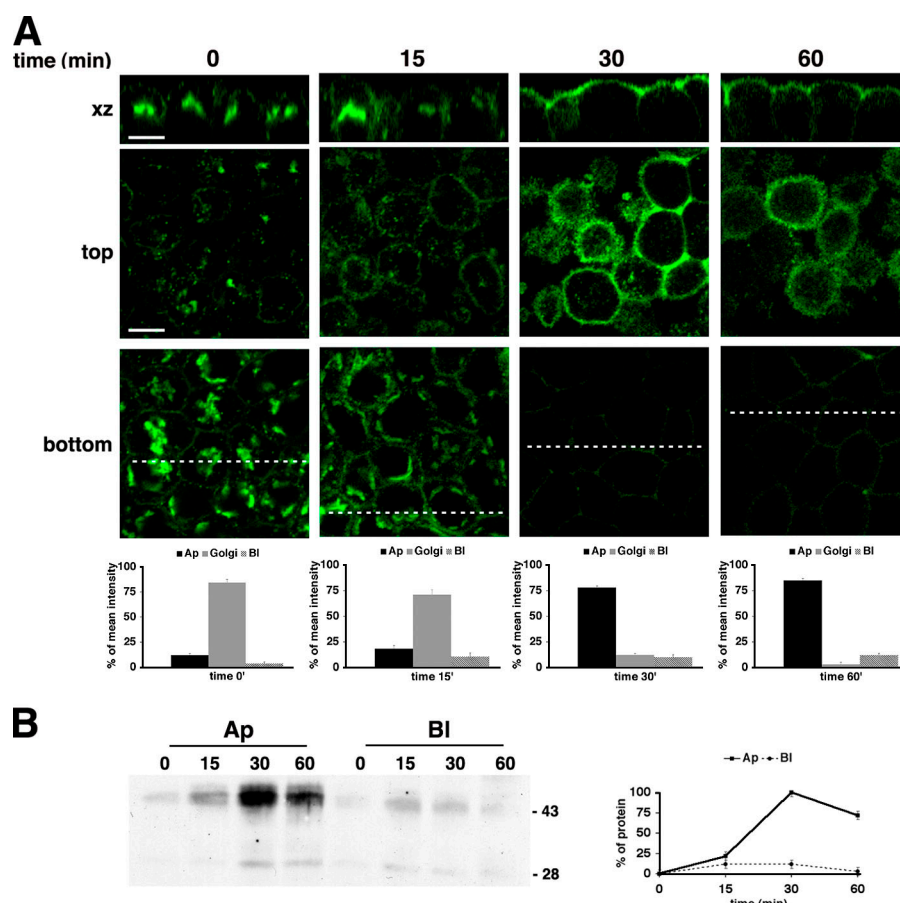
the GFP-GPI that was detected in the apical media after 60 min of chase time both in control and in treated cells likely represents the proportion of protein that is normally shedded from the cell surface, and it runs on the gel at its expected molecular weight. These experiments further confirm that GFP-GPI does not need to travel through the basolateral surface before reaching the apical plasma membrane.

As an alternative to trypsin, we used tannic acid, a cell-impermeable fixative that cross-links cell surface carbohydrate groups and does not diffuse across tight junctions (Newman et al., 1996; Polishchuk et al., 2004). When added selectively to the different domains of the plasma membrane of filter-grown cells, tannic acid would be expected to inhibit plasma membrane fusion and internalization only in the specific domain to which it was added. To check whether the tannic acid impairs internalization in MDCK cells, we followed transferrin endocytosis (Fig. S3, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>). In control cells, transferrin was exclusively localized in intracellular spots, whereas in cells treated with tannic acid, it was blocked at the cell surface after 30 min of internalization (Fig. S3, top). We also show that tannic acid does not affect binding but only affects the internalization of transferrin by allowing first its binding for 5 min at 37°C and then the internalization for 30 min in the presence or absence of basolateral tannic acid (Fig. S3, bottom). Also in this case, in the presence of tannic acid, transferrin was exclusively found at the basolateral membrane. Furthermore, these results showed that a pretreatment with tannic acid for 30 min impairs plasma membrane internalization at least for the next 30 min. Thus, it appeared to be a convenient tool to analyze whether a protein follows a transcytotic pathway via the basolateral surface

because this process requires the protein to first be endocytosed (Polishchuk et al., 2004).

To analyze the effect of tannic acid on GFP-GPI trafficking, we repeated the same cold targeting assay as described in Fig. 2. After the trypsin treatment, cells grown for 4 d on filters were incubated at 19.5°C in the presence of cycloheximide for 2 h to accumulate the protein in the Golgi. During the last 30 min at 19.5°C, 0.5% tannic acid was added to the basolateral medium to block basolateral fusion. After washing to remove tannic acid, the monolayers were then incubated at 37°C in the presence of cycloheximide for the different indicated times to follow the arrival of the protein at the surface (Fig. 4, A and B). We found both by confocal microscopy (Fig. 4 A) and by surface biotinylation (Fig. 4 B) that in the presence of tannic acid, GFP-GPI still reached the apical surface directly with similar kinetics to the untreated cells (Fig. 2, A and B). However, by confocal microscopy, it appears that in tannic acid-treated cells, trafficking of the protein is slightly slower, and the newly arrived protein appears to fuse or accumulates mainly at the edge of the apical surface above the tight junctions. Unexpectedly, a small portion of GFP-GPI was detected on the bottom confocal sections or by biotinylation of the basolateral surface. This basolateral signal could result either from the fusion of some GFP-GPI-containing carriers with the basolateral surface or from diffusion of the protein from the apical domain, therefore implying either an incomplete effect of tannic acid in blocking basolateral fusion or an effect of tannic acid on the integrity of the tight junctions. Nonetheless, both the tannic acid and the trypsin experiments showed that GFP-GPI does not need to reach the basolateral surface to be apically sorted but is directly targeted to the apical membrane.

Figure 4. Tannic acid does not affect the apical targeting of GFP-GPI. MDCK cells stably expressing GFP-GPI grown on filter were incubated with trypsin and subjected to a temperature block in the TGN (see Materials and methods). Tannic acid was added to the basolateral medium 30 min before release from the 20°C block. Cells were then warmed at 37°C for the indicated times in the absence of tannic acid in culture medium containing cycloheximide. After each time point, cells were fixed and quenched. Serial confocal sections were collected from the top to the bottom of cell monolayers (A). The dashed lines show the positions from where the xz sections were taken. Mean fluorescence intensities at the Golgi, apical (Ap), and basolateral (Bl) domains were measured as in Fig. 2. Alternatively, surface proteins were biotinylated from the apical or basolateral side, immunoprecipitated with GFP antibody, and revealed by using HRP-streptavidin (B). Results from three different experiments were plotted as the percentage of the amount at the time of maximal surface expression. The value at the apical or basolateral surface at time = 0 was subtracted from all chase times. Error bars represent SD. Bars, 10 μ m.



Long-term incubation with tannic acid alters the integrity of fully polarized monolayers and causes the mislocalization of GFP-GPI

We reasoned that if the low level of basolateral missorting observed in the aforementioned experiments was caused by an initial effect of tannic acid on the integrity of the monolayer, it should increase with the time of the treatment. Therefore, we incubated cells grown on filter for 4 d with basolateral tannic acid during the last 10 min of the temperature block and during all chase times at 37°C as shown previously by Polishchuk et al. (2004). The cells were then fixed and imaged by confocal microscopy or subjected to surface biotinylation (Fig. 5). Also in this case, at time = 0, GFP-GPI is present in the Golgi apparatus. However, after 30 min of chase, it is present both on the apical and on the basolateral surface and continues to be completely mislocalized after 60 min (Fig. 5 A). These results were confirmed by the surface biotinylation assay that showed a complete mislocalization of the protein (Fig. 5 B). These data suggest that a long treatment with tannic acid leads to monolayer depolarization.

To address whether tannic acid could alter the integrity of the cell monolayer, we evaluated the functional state of tight junctions during tannic acid treatment by different methods (Matter and Balda, 2003). First, we investigated the morphology of the tight junctions by staining them with an antibody against PATJ (Pals1-associated tight junction protein), a component of

tight junctions (Lemmers et al., 2002; Shin et al., 2005). To verify that the basolateral domain maintains its physical integrity, we labeled the cells with an antibody against Na,K-ATPase (Fig. 6 A). In control cells, PATJ staining results in a chicken wire-like pattern (typical of tight junction markers) that was detected exclusively in one z plane (at 2.5 μ m from the out-of-focus top signal) where the signal for the Na,K-ATPase was almost completely out of focus. On the other hand, a distinct signal for Na,K-ATPase was detectable starting at 6.5 μ m from the top out-of-focus signal all along the lateral membrane (Gottardi and Caplan, 1993; Zurzolo and Rodriguez-Boulán, 1993). In contrast, in cells treated with tannic acid, the PATJ signal was found also in the bottom planes at the same level where the Na,K-ATPase-derived signal was in focus. This effect was more evident after 60 min of treatment. These results indicated that tight junctions were impaired by tannic acid treatment. To then check the integrity of the monolayers, we measured both the passage of electric current and the flux of a tracer across monolayers, which are the two most commonly used methods to analyze the integrity of tight junctions (Matter and Balda, 2003).

Transepithelial resistance (TER) of fully polarized monolayers was measured before and after basolateral incubation with tannic acid for 30–60 min. Although in control cells TER is stable during the time course of the measurements, in treated cells, it decreased progressively (Fig. 6 B). After 60 min of tannic acid treatment, the TER decreased to the value of empty filters.

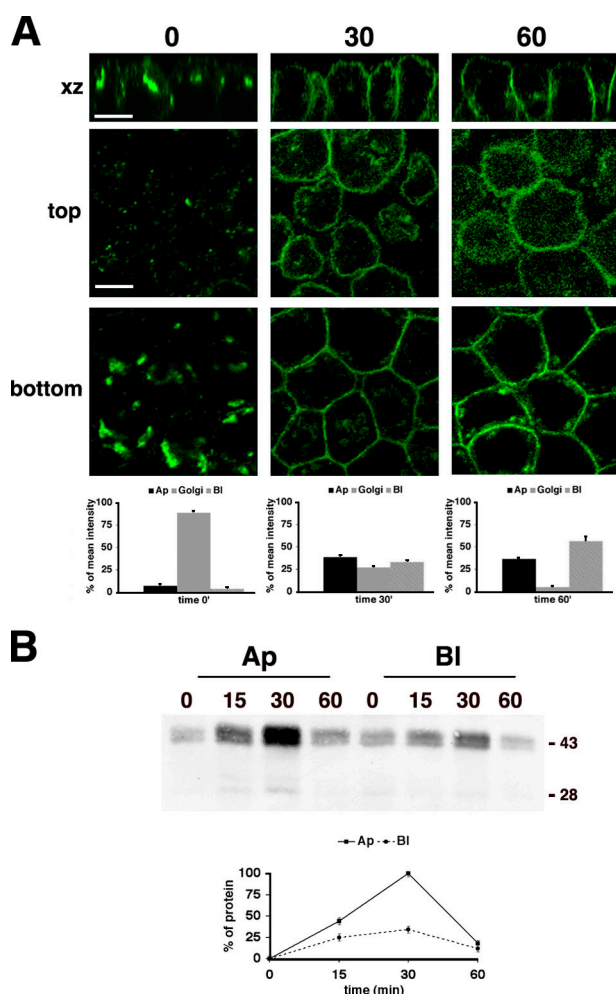


Figure 5. Long tannic acid treatment leads to the depolarization of GFP-GPI. MDCK cells stably expressing GFP-GPI grown on filter were incubated with trypsin and subjected to a temperature block in the TGN. Tannic acid was added to the basolateral medium 10 min before release from the 20°C block. Cells were warmed at 37°C for the indicated times in culture medium containing cycloheximide in the presence of tannic acid. After each time point, cells were fixed, quenched, and analyzed by confocal microscopy. Mean fluorescence intensities at the Golgi, apical (Ap), and basolateral (BI) domains were measured as in Fig. 2. Alternatively, surface proteins were biotinylated from the apical or the basolateral side, immunoprecipitated with GFP antibody, and revealed by using HRP-streptavidin (B). Results from three different experiments were plotted as percentages of the amount at the time of maximal surface expression. The value at the apical or basolateral surface at time = 0 was subtracted from all chase times. Error bars represent SD. Bars, 10 μ m.

Finally, we performed a permeability assay using [14 C]inulin as previously described (Apodaca et al., 1995). Cells grown on filter for 4 d were treated with tannic acid on the basolateral side for 30 or 60 min. At the same time, [14 C]inulin (1 μ Ci per filter) was added to the apical medium. Subsequently, apical and basolateral media were recovered, and C^{14} was quantified. The extent of inulin passage was quantified by dividing the amount of [14 C]inulin found in the basal chamber by the total [14 C]inulin added to each sample. We found that in the control cell monolayer, only $0.25 \pm 0.01\%$ and $0.49 \pm 0.03\%$ of apically added [14 C]inulin for 30 or 60 min, respectively, was found in the basal well, whereas in the cells treated for the

same length of time with basolateral tannic acid, $1.2 \pm 0.01\%$ and $3.75 \pm 0.09\%$ was collected after 30 and 60 min, respectively (Fig. 6 C). These results clearly show that the permeability of the cell monolayer is strongly altered by tannic acid treatment in a time-dependent manner (fivefold more after 30 min and eightfold more after 60 min). Thus, the nonpolarized targeting results shown in Fig. 5 (A and B) are explained by the fact that after long tannic acid treatment, although the intracellular sorting might still occur, the polarity is lost because tight junctions are impaired and the monolayer permeability is altered, thus allowing both apical/basolateral protein diffusion and passage of the biotin between the apical and basolateral compartments.

Monitoring of GFP-GPI apical targeting in living, fully polarized filter-grown cells

Although the aforementioned confocal and biochemical experiments clearly showed a direct apical arrival of GFP-GPI, they represent images taken at specific times of chase corresponding to times used in the biochemical assays. The most direct method to analyze the targeting pathway of GPI-APs would be to follow the route of GFP-GPI all the way from the Golgi to the surface in living cells using an imaging approach. This has never been possible before in fully polarized cells grown on filters because of the limits of the imaging systems for acquisition along the z axis, so all the dynamic studies on protein sorting to date have been performed in cells grown on coverslips in semipolarized conditions (Jacob and Naim, 2001; Keller et al., 2001; Jacob et al., 2003; Polishchuk et al., 2004). We used a confocal imaging system based on spinning disc technology that has the advantage of being faster and causes less photobleaching in comparison with laser scanning-based confocal methods. This system has been previously used to follow apical and basolateral cargos for short times in cells grown to confluency on coverslips (Kreitzer et al., 2003), whereas we have used it to monitor the arrival of GFP-GPI from the Golgi to the plasma membrane in live cells grown on filters in fully polarized conditions (Fig. 7). After incubation at 19.5°C, cells grown on filters were warmed at 37°C on the microscope stage, and images were taken every 3 min for a total of 60 min (Fig. 7 A). For each time point, an average of 20 z planes were collected to detect the signal from the whole cell volume. In Fig. 7 A, selected frames of the time lapse show a gradual brightening only of the apical surface as a result of GFP-GPI arrival both in control and tannic acid-treated cells. However, from the side view images (Fig. 7 A, bottom), it is possible to note an extension of the fluorescent signal toward the lateral side of the cells in the presence of tannic acid. Videos 1 and 2 (for control and treated cells, respectively; available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>) obtained after volume rendering clearly showed that the fluorescent signal of GFP-GPI, which is present at the beginning of the experiment at the TGN, gradually brightened the apical surface, whereas no transient brightening was observed at the basolateral surface (as indicated by rotation of the entire cell monolayer). Furthermore, Videos 3 and 4 (for control and treated cells, respectively) mounted with a rotation of 45° with respect to the z axis showed clearly that the signal reached the apical surface progressively, which was well defined by its typical dome aspect.

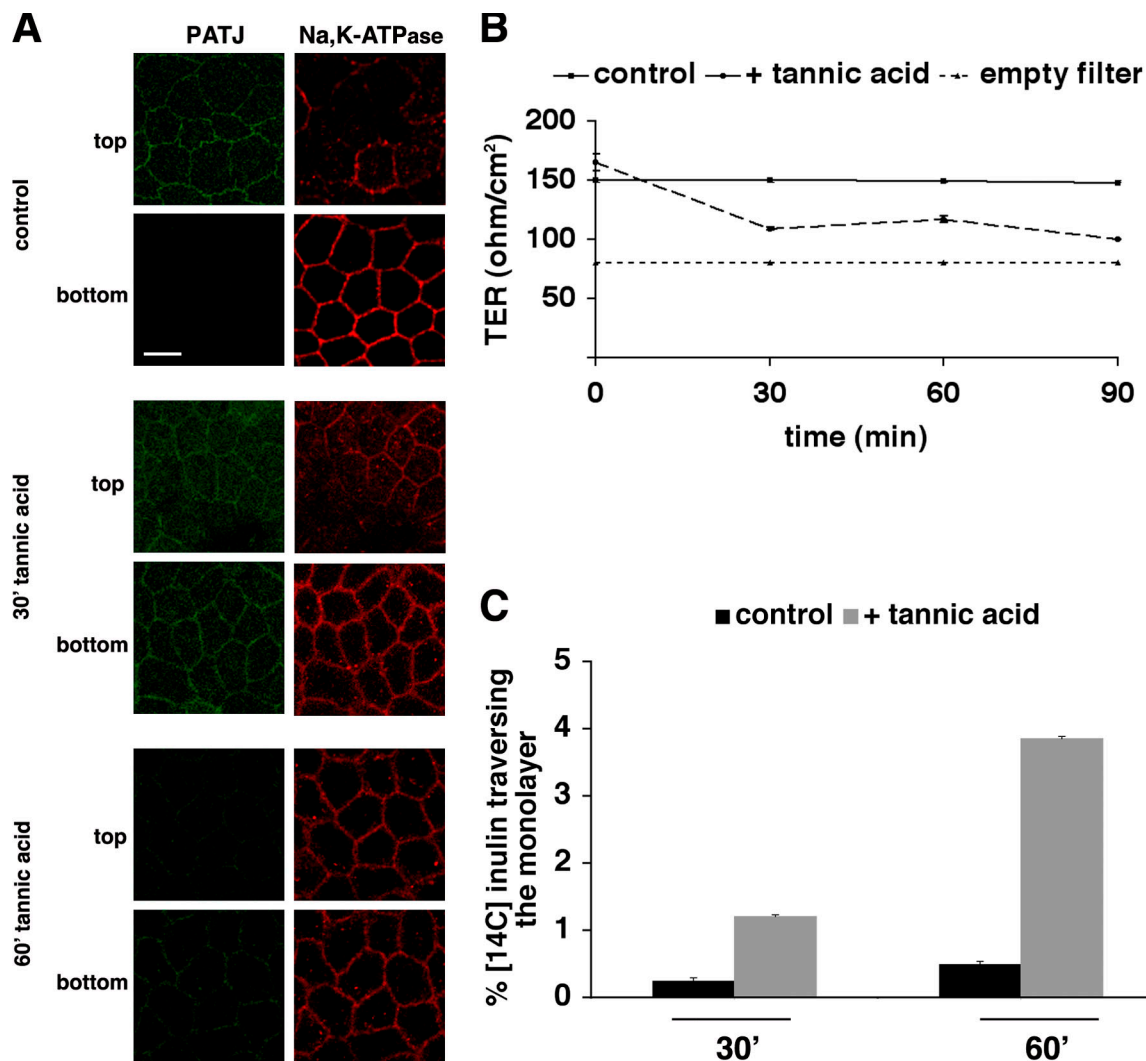


Figure 6. Long tannic acid treatment alters the tight junctions and affects the integrity of the monolayer. Tannic acid was added to MDCK cells grown on filters for 30 or 60 min at 37°C. (A) Cells were then fixed and stained with specific antibodies against PATJ (green) and Na,K-ATPase (red) in permeabilized conditions. Serial confocal sections were collected from the top to the bottom of cell monolayers. (B) After culturing MDCK cells on filter for 4 d, media were replaced, and transepithelial resistance (TER) was measured periodically over 90 min in the absence (control) or presence of tannic acid added to the basolateral side. (C) [^{14}C]inulin was added to the apical medium of MDCK cells grown on filter, whereas tannic acid was added (or not; control) to the basolateral medium for the indicated times at 37°C. The permeability of the monolayers was subsequently assessed by quantitating the percentage of apical [^{14}C]inulin found in the basal well. The data are means \pm SD (error bars) of three experiments. Bar, 10 μm .

Finally, by observing the cells from the top (Videos 5 and 6 for control and treated cells, respectively), the progressive accumulation over time of GFP-GPI exclusively on the top of the cell was particularly evident. A better resolution was obtained by collecting three-dimensional stacks every 60 s, thereby reducing the possibility of missing a rapid passage through the basolateral surface (Fig. 7 B and Videos 7 and 8). Furthermore, to avoid both the light absorption and the background from the filter, we seeded cells on filters upside down. In these growing conditions, GP114 and Na,K-ATPase, which are endogenous apical and basolateral markers, respectively, are correctly localized as shown by immunofluorescence (Fig. S4 A), indicating that cells were well polarized.

To monitor the arrival of GFP-GPI at the surface, we had to take images every 1 or 3 min for up to 60 min at low magnification, which did not allow the direct visualization of

post Golgi carriers. To visualize the trafficking of GFP-GPI-containing carriers in cells grown on filters, we imaged the cells every 2–3 s for short time intervals (3–5 min) at high magnification. A range of 4–6 μm in depth of the cell from the bottom to the top of the Golgi apparatus was collected every 2–3 s. The time lapses showed GFP-GPI-containing membranes budding from the Golgi complex as tubular processes and post-Golgi intermediates moving toward the surface (Video 9, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>). These three-dimensional images were comparable in resolution with the ones taken before in single plane in nonpolarized cells (Keller et al., 2001; Polishchuk et al., 2004).

To determine the site of segregation of apical and basolateral cargos, we transiently cotransfected the CFP and YFP variants of GFP-GPI and GFP-PIT (a fusion construct between the transmembrane and cytosolic domains of the low density

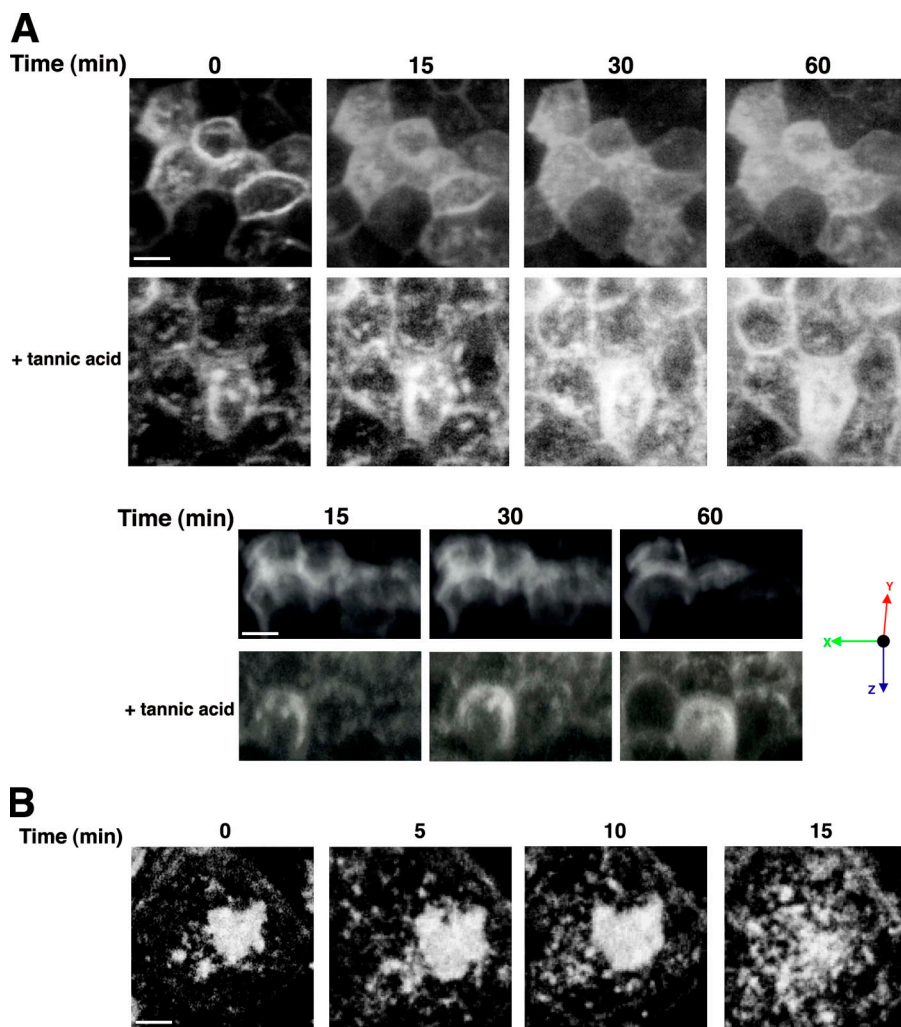


Figure 7. GFP-GPI is directly delivered to the apical surface in living MDCK cells both in the presence and absence of tannic acid. MDCK cells stably expressing GFP-GPI were treated as in Figs. 2 and 4. After the temperature block, cells were shifted at 37°C on the microscope and imaged live every 3 min for 60 min (A) or every 1 min for 15 min (B; also see Videos 1–8, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>). Some frames of the time lapses three-dimensionally reconstructed with different orientations [A (top) and B, view from the apical side; A (bottom), view from the lateral side] are shown. Bars, 10 μ m.

lipoprotein receptor and GFP, which is basolaterally localized as shown in Fig. S4 B), respectively. As previously described (Keller et al., 2001; Kreitzer et al., 2003; Polishchuk et al., 2004), we also found that GFP-GPI is partially segregated from a basolateral protein (YFP-PIT) in the TGN (Fig. S4 C, top) and that these proteins appear to be in distinct carriers after 10 min of release of the block (Fig. S4 C, bottom). Thus, our data demonstrate that in fully polarized monolayers, the apical delivery of GPI-APs occurs via a direct pathway, and it supports the notion that their sorting occurs intracellularly before arrival at the plasma membrane.

Discussion

Several studies have shown that apical and basolateral proteins segregate into different vesicles upon exit from the TGN (Wandinger-Ness et al., 1990; Keller et al., 2001; Kreitzer et al., 2003). GPI-APs are delivered to the apical membrane via a raft-mediated mechanism (Arreaza and Brown, 1995; Lipardi et al., 2000) and have been thought to be sorted in the TGN (Mayor and Riezman, 2004). Imaging studies in living cells have shown that GPI-APs segregate from basolateral proteins in separate carriers in the TGN, and, from there, they reach the apical surface directly (Keller et al., 2001).

Notwithstanding, a recent study based on imaging in living cells of one GPI protein (GFP-GPI) has proposed a mechanism whereby GPI-APs may use a transcytotic route to the apical surface of MDCK cells and, therefore, that their sorting occurs after arrival to the basolateral plasma membrane (Polishchuk et al., 2004). These data are in direct contrast with our model of the mechanism of GPI-AP sorting, which is based on segregation and stabilization of GPI-APs in rafts at the level of the Golgi apparatus. We believe that these two events would lead to the budding of an apical carrier that excludes basolateral proteins (Paladino et al., 2004). Because Polishchuk et al. (2004) also observed a physical segregation of the apical and basolateral cargo in the TGN, the question arises as to why this segregation would occur in regions of the Golgi membrane if the proteins are transported in the same carrier to the basolateral surface where sorting would then occur.

We directly investigated the pathway followed by three different GPI-APs to the apical surface in MDCK cells both by biochemical and imaging approaches in fully polarized cells that were grown on filters for 4 d. By using pulse-chase experiments combined with selective surface biotinylation, we found that newly synthesized proteins, PLAP, GFP-GPI, and NTR-PLAP progressively reach the apical plasma membrane without

passing through the basolateral surface (Figs. 1 and S1 A). Indeed, we never observed accumulation on the basolateral surface before the apical appearance of these proteins. We obtained the same results when we examined GFP-GPI transport to the surface that previously accumulated in the TGN after a temperature block (Figs. 2 and 7). Furthermore, by using a spinning disc confocal-based instrument, we could analyze the arrival of GFP-GPI from the Golgi to the surface in living cells grown on filters (Fig. 7 and Videos 1–9). This was not previously possible because of the thickness of polarized monolayers and the speed and sensitivity of commercially available imaging systems. The results obtained by the biochemical and imaging methods concordantly demonstrate that both newly synthesized and recycled GPI-APs are directly delivered from the TGN to the apical surface, suggesting that they are sorted intracellularly. These results were confirmed by the fact that neither basolateral cleavage by trypsin (Fig. 3) nor addition to the basolateral domain of tannic acid (Fig. 4), which inhibits basolateral transferrin endocytosis (Fig. S3), affect the apical delivery of GFP-GPI. This demonstrates that we did not miss any rapid or transient passage through the basolateral surface that could have been undetectable in the less sensitive biotinylation-based targeting assays.

The discrepancy between the results of Polishchuk et al. (2004) and our own most likely lies in the cell culture conditions and in the different methods used. The Polishchuk et al. (2004) experiments were performed in MDCK cells grown on filters for only 2–3 d, when the cells are not, in fact, fully polarized. When we performed our experiments in similar nonpolarized conditions, we found that both GFP-GPI and PLAP were missorted to the basolateral surface (Fig. 1 B) and that this missorting decreased with the time the cells were in culture (Fig. 1 C). Interestingly, in one experiment after 1.5 d in culture, we observed a transient peak of GFP-GPI at the basolateral surface before it was apically delivered (Fig. S1 B), which might suggest that it uses a transcytotic pathway in semipolarized conditions. However, as previously demonstrated, the transitory use of the transcytotic pathway appears to be a protein-specific feature (Zurzolo et al., 1992), and, in this specific case, it was observed only for GFP-GPI and for NTR-PLAP (Fig. S1 A) but not for PLAP. In addition, we demonstrate that 30 min of tannic acid is sufficient to block transferrin internalization, but it does not impair the direct apical delivery of GFP-GPI from the TGN in fully polarized cells (Fig. 4). However, when we used the same conditions as Polishchuk et al. (2004), who treated the cells with tannic acid for a longer time period (45–60 min treatment), we found that GFP-GPI becomes progressively depolarized (Fig. 5). Indeed, a prolonged treatment with tannic acid causes a redistribution of tight junction proteins and alters the integrity of the monolayer (Fig. 6), thus permitting protein diffusion from one domain to the other. Strangely enough, Polishchuk et al. (2004) did not report a basolateral GFP-GPI signal but described only accumulation in intracellular compartments. In some cells, we also observed some intracellular patches below the plasma membrane, as they described (Fig. 5, bottom; 60 min), but never saw an impairment of apical delivery (Figs. 4 and 7 and Videos 1–8). This difference could derive from the

fact that they used transiently expressing cells, whereas we have used stable clones. It is well known that transiently transfected cells overexpress proteins, and overexpression is known to saturate the sorting mechanisms and to lead to missorting or the use of different pathways not used by the cells in normal conditions (Marmorstein et al., 2000).

Because, in our hands, apical surface delivery of GFP-GPI occurs rapidly (apical GFP-GPI was detected as early as 15 min after warming cells at 37°C after temperature block; Figs. 2 and 7), it is unlikely that the transcytotic route determines its steady-state distribution. In hepatocyte 5' nucleotidase, a GPI protein following a transcytotic route to the apical surface requires 3.5 h to reach steady-state apical distribution, and this rate of transcytosis is much slower than that observed for transmembrane proteins (Schell et al., 1992). GPI-APs are slowly endocytosed from both sides (Lisanti et al., 1990; Keller et al., 1992), and they also recycle back to the surface three- to fourfold slower than other recycling membrane components (Chatterjee et al., 2001; Mayor and Riezman, 2004). Furthermore, Polishchuk et al. (2004) also found that YFP-GPI needs 2 h to be transcytosed from the basolateral side. Therefore, this discrepancy in the timing of kinetics of the arrival to the surface and the transcytotic process is inconsistent with the fact that the basolateral fraction of GPI-APs is a precursor to the apical pool. We directly ruled out this possibility by measuring the amount of missorted basolateral GFP-GPI that was internalized from the basolateral membrane in 1.5-d-old monolayers. In these conditions, a small portion (~6–8%) of GFP-GPI appeared inside the cells after 30 min of internalization at 37°C (Fig. S5, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>), suggesting a slow internalization rate inconsistent with the use of a transcytotic pathway. However, in agreement with previous data (Zurzolo et al. 1992), this experiment also showed that some of the protein that missorted to the basolateral membrane in cells that were not fully polarized can reach the apical surface via a transcytotic pathway, as we observed the appearance of GFP-GPI at the apical surface 60 and 120 min after internalization (Fig. S5).

Our data also support the model that sorting of GPI-AP occurs intracellularly. We have recently proposed that GPI-AP oligomerization or clustering in high molecular weight complexes is the prime mechanism determining the apical sorting of GPI-APs (Paladino et al., 2004). This is because it leads to the stabilization of proteins into rafts and to the coalescence of more rafts with the consequent formation of larger functional rafts, which provide the platform for the budding of an apical carrier. Oligomerization of GPI-APs begins in the medial Golgi and is concomitant with raft association (Paladino et al., 2004), therefore supporting the hypothesis that apical GPI-AP sorting occurs at the TGN. In this study, we show that segregation between GFP-GPI and a basolateral marker (GFP-PIT) occurs during the block in the TGN and that the two proteins appear in distinct carriers after 10 min of chase at 37°C. Nonetheless, we cannot exclude the possibility that GPI-APs require travel through some endosomal compartments before reaching the apical membrane. Recently, it has been found that the inactivation of REs affect the transport of VSV-G and of an apically targeted mutant from the Golgi to the plasma membrane, suggesting

a role of REs for polarized sorting in endocytic and secretory pathways (Ang et al., 2004).

A presurface post-Golgi compartment could act as a main sorting station or as a second step after sorting at the TGN. Alternatively, it could be a pathway of salvage in the case of partial polarity or of saturation of the normal sorting machinery. For basolateral proteins, it has indeed been shown that the same sorting signals function at the level of the TGN and REs. Further studies focused and optimized to visualize the trafficking between these compartments in fully polarized cells are necessary to elucidate these different possibilities.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen. Antibodies were purchased from the following companies: polyclonal anti-GFP from CLONTECH Laboratories, Inc.; monoclonal anti-GFP and Cy-5 transferrin from Invitrogen; anti-PLAP from Rockland Biosciences; and anti-Na, K-ATPase from Upstate Biotechnology. The antibodies against PATJ, GP114, and p75^{NTR} were gifts from A. le Bivic (Faculté des Sciences de Luminy, Marseille, France). Biotin and streptavidin beads were obtained from Pierce Chemical Co. HRP-linked antibodies and streptavidin were purchased from GE Healthcare. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfections

MDCK cells were grown in DME containing 5% FBS. Stable clones expressing GFP-GPI and PLAP were previously obtained (Paladino et al., 2004). In particular, the GFP-GPI construct previously used by us and others (Nichols et al., 2001; Paladino et al., 2004; Polishchuk et al., 2004) was a gift from S. Lacey (Southwestern University, Georgetown, TX). The fusion was constructed in the eukaryotic expression vector pJB20. It has an EcoRI site at the 5' end, a HindIII site at the 3' end, and a PstI site that separates the ecto- and anchor domain. TER was measured using a meter (Millicell-ERS; Millipore).

Fluorescence microscopy

Unless specifically indicated, MDCK cells were grown on Transwell filters for 3.5–4 d, washed with PBS containing CaCl₂ and MgCl₂, fixed with 4% PFA, and quenched with 50 mM NH₄Cl. Depending on the experiment, cells were permeabilized with 0.075% saponin. Primary antibodies were detected with FITC or TRITC-conjugated secondary antibodies. Images were collected using a laser scanning confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss Microimaging, Inc.) equipped with a plan Apo 63× NA 1.4 oil immersion objective lens (Carl Zeiss Microimaging, Inc.). As previously described (Nichols et al., 2001), the quantification of mean fluorescence intensities in selected regions of interest were performed using a laser scanning microscope (LSM 510; Carl Zeiss Microimaging, Inc.). In particular, the fluorescence intensities of areas of equal size in a single z plane through the cell monolayer (from a range of 1–3, 4–6, and 8–12 μm starting from the top of the cell for apical, Golgi, and basolateral signals, respectively) were measured and corrected for background.

Time-lapse images were collected using a confocal microscopy system (UltraView ERS; PerkinElmer) equipped with a microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss Microimaging, Inc.). A plan Apo 63× or a 100× NA 1.4 oil immersion objective lens was controlled by a piezoelectric z stepper. To image living cells, we mounted the filter on an optical glass in a petri dish containing CO₂ independent medium (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, and 20 mM Hepes, pH 7.4). Cells were imaged using a thermostatic chamber mounted on the microscope set at 37°C. Cells were imaged every 3 min for a total of 50–60 min or every 1 min for 10–15 min, collecting 15 or 20 z slices (confocal depth of 0.5 μm) each time. For short time lapses (3–5 min), cells were imaged every 2 s, collecting four to six z slices (confocal depth of 1 μm) at high magnification using a plan Apo 100× NA 1.4 oil immersion objective lens and an optovar 1.6× lens. Images and videos were volume rendered by Volocity software (PerkinElmer).

Targeting assays

Labeling assay. Cells grown on filter were starved of methionine for 1 h and pulse labeled for 15 min with medium containing 100 μCi/ml [³⁵S]methionine (GE Healthcare) and incubated in chase medium (DME con-

taining 5% FBS and 10× methionine) for different times. At the end of each chase time, cells were selectively biotinylated and processed as described in the supplemental material (available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>). Lysates were immunoprecipitated with specific antibodies, and biotinylated antigens were then precipitated with streptavidin beads. Samples were run on SDS-PAGE and analyzed by a phosphorimager. Quantifications were performed by ImageQuant (GE Healthcare).

Cold assay. Cells grown on filter were incubated with 25 μg/ml trypsin in DME without serum for 30 min twice. They were then subjected to temperature block as described below and warmed at 37°C for different times in culture medium containing 150 μg/ml cycloheximide. At the end of each time point, surface proteins were selectively biotinylated, immunoprecipitated with an antibody against GFP, and run on SDS-PAGE. Biotinylated proteins were revealed by HRP-conjugated streptavidin. Quantifications were performed with Image software (National Institutes of Health).

Temperature block

To achieve an almost complete protein block in the TGN, we used a previously published protocol (Paladino et al., 2004). Filter-grown cells were incubated at 19.5°C for 2 h in areal medium (F12 Coon's modified medium without NaHCO₃ and with 0.2% BSA and 20 mM Hepes, pH 7.4). In the last hour at 19.5°C, they were treated with 150 μg/ml cycloheximide.

Permeability assay

1 μCi [¹⁴C]inulin (MP Biomedicals) diluted in 500 μl DME was added to the apical chamber of the Transwell filters, and cells were incubated for 30 or 60 min at 37°C. The amount of [¹⁴C]inulin that remained in the apical well, traversed the filter to the basal well, or remained cell associated was quantified in a liquid scintillation counter.

Online supplemental material

Fig. S1 shows pulse chase and biotinylation targeting assays. In fully polarized cells (A), NTR-PLAP is directly targeted to the apical surface, whereas it undergoes transcytosis in unpolarized cells. In not fully polarized cells (B), a portion of GFP-GPI can be indirectly sorted to the apical membrane. Fig. S2 shows by immunofluorescence (A) and Western blotting (B) that trypsin is a suitable tool to remove GFP-GPI without impairing the integrity of the cell monolayer. Fig. S3 shows that tannic acid impairs transferrin internalization but does not affect surface binding. Fig. S4 A shows that apical and basolateral markers are correctly localized in cells grown on filters upside down, indicating that cells are well polarized. It also shows that YFP-PIT is basolaterally localized, and it is partially segregated from CFP-GPI at the TGN and is in different post-TGN carriers (B and C, respectively). Fig. S5 shows that ~6–8% of GFP-GPI is slowly internalized from the basolateral surface. Videos 1–9 show the arrival of GFP-GPI from the TGN to the plasma membrane. They clearly show the direct appearance of GFP-GPI fluorescence at the apical surface both in control and tannic acid-treated cells. All z planes were volume rendered by Volocity software. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200507116/DC1>.

We thank Dr. Chris Bowler for critical reading of the manuscript, Dr. A. le Bivic for helpful discussions, and Dr. C. Blackmore (PerkinElmer) for help in image processing.

This work was supported by grants to C. Zurzolo from the Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica, Programmi a Cofinanziamento Programmi di Ricerca di Interesse Nazionale 2004, Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base 2003, and the European Union (HPRN_CT_2000_00077).

Submitted: 22 July 2005

Accepted: 13 December 2005

References

- Ang, A.L., T. Taguchi, S. Francis, H. Folsch, L.J. Murrells, M. Pypaert, G. Warren, and I. Mellman. 2004. Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 167:531–543.
- Apodaca, G., and K.E. Mostov. 1993. Transcytosis of placental alkaline phosphatase-polymeric immunoglobulin receptor fusion proteins is regulated by mutations of Ser664. *J. Biol. Chem.* 268:23712–23719.
- Apodaca, G., M. Bomsel, R. Lindstedt, J. Engel, D. Frank, K.E. Mostov, and J. Wiener-Kronish. 1995. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa*-induced MDCK cell injury: glycosylation-defective host cells are resistant to bacterial killing. *Infect. Immun.* 63:1541–1551.

- Arreaza, G., and D.A. Brown. 1995. Sorting and intracellular trafficking of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and two hybrid transmembrane proteins with the same ectodomain in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 270:23641–23647.
- Bonifacino, J.S., and L.M. Traub. 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72:395–447.
- Brown, D.A., and J.K. Rose. 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68:533–544.
- Casanova, J.E., P.P. Breitfeld, S.A. Ross, and K.E. Mostov. 1990. Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science.* 248:742–745.
- Chatterjee, S., E.R. Smith, K. Hanada, V.L. Stevens, and S. Mayor. 2001. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. *EMBO J.* 20:1583–1592.
- Chuang, J.Z., and C.H. Sung. 1998. The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J. Cell Biol.* 142:1245–1256.
- Folsch, H., H. Ohno, J.S. Bonifacino, and I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell.* 99:189–198.
- Folsch, H., M. Pypaert, S. Maday, L. Pelletier, and I. Mellman. 2003. The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains. *J. Cell Biol.* 163:351–362.
- Gottardi, C.J., and M.J. Caplan. 1993. Delivery of Na⁺,K⁺-ATPase in polarized epithelial cells. *Science.* 260:552–554.
- Griffiths, G., and K. Simons. 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science.* 234:438–443.
- Inouye, S., and F.I. Tsuji. 1994. Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett.* 341:277–280.
- Jacob, R., and H.Y. Naim. 2001. Apical membrane proteins are transported in distinct vesicular carriers. *Curr. Biol.* 11:1444–1450.
- Jacob, R., M. Heine, M. Alfalah, and H.Y. Naim. 2003. Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr. Biol.* 13:607–612.
- Keller, G.A., M.W. Siegel, and I.W. Caras. 1992. Endocytosis of glycopospholipid-anchored and transmembrane forms of CD4 by different endocytic pathways. *EMBO J.* 11:863–874.
- Keller, P., D. Toomre, E. Diaz, J. White, and K. Simons. 2001. Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat. Cell Biol.* 3:140–149.
- Kreitzer, G., J. Schmoranz, S.H. Low, X. Li, Y. Gan, T. Weimbs, S.M. Simon, and E. Rodriguez-Boulant. 2003. Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 5:126–136.
- Lemmers, C., E. Medina, M.H. Delgrossi, D. Michel, J.P. Arsanto, and A. Le Bivic. 2002. hINAD/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277:25408–25415.
- Lipardi, C., L. Nitsch, and C. Zurzolo. 2000. Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol. Biol. Cell.* 11:531–542.
- Lisanti, M.P., I.W. Caras, T. Gilbert, D. Hanzel, and E. Rodriguez-Boulant. 1990. Vectorial apical delivery and slow endocytosis of a glycolipid-anchored fusion protein in transfected MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7419–7423.
- Luo, W., and A. Chang. 2000. An endosome-to-plasma membrane pathway involved in trafficking of a mutant plasma membrane ATPase in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 11:579–592.
- Marmorstein, A.D., K.G. Csaky, J. Baffi, L. Lam, F. Rahaal, and E. Rodriguez-Boulant. 2000. Saturation of, and competition for entry into, the apical secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:3248–3253.
- Matter, K. 2000. Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr. Biol.* 10:R39–R42.
- Matter, K., and M.S. Balda. 2003. Functional analysis of tight junctions. *Methods.* 30:228–234.
- Mayor, S., and H. Riezman. 2004. Sorting GPI-anchored proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:110–120.
- Mellman, I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:575–625.
- Monlauzeur, L., L. Breuza, and A. Le Bivic. 1998. Putative O-glycosylation sites and a membrane anchor are necessary for apical delivery of the human neurotrophin receptor in Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 273:30263–30270.
- Mostov, K.E., A. de Bruyn Kops, and D.L. Deitcher. 1986. Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. *Cell.* 47:359–364.
- Mostov, K.E., M. Verges, and Y. Altschuler. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:483–490.
- Newman, T.M., M. Tian, and B.D. Gomperts. 1996. Ultrastructural characterization of tannic acid-arrested degranulation of permeabilized guinea pig eosinophils stimulated with GTP-gamma-S. *Eur. J. Cell Biol.* 70:209–220.
- Nichols, B.J., A.K. Kenworthy, R.S. Polishchuk, R. Lodge, T.H. Roberts, K. Hirschberg, R.D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex. *J. Cell Biol.* 153:529–541.
- Paladino, S., D. Sarnataro, R. Pillich, S. Tivodar, L. Nitsch, and C. Zurzolo. 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J. Cell Biol.* 167:699–709.
- Polishchuk, R., A. Di Pentima, and J. Lippincott-Schwartz. 2004. Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat. Cell Biol.* 6:297–307.
- Rodriguez-Boulant, E., G. Kreitzer, and A. Musch. 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:233–247.
- Sarnataro, D., L. Nitsch, W. Hunziker, and C. Zurzolo. 2000. Detergent insoluble microdomains are not involved in transcytosis of polymeric Ig receptor in FRT and MDCK cells. *Traffic.* 1:794–802.
- Scheiffele, P., J. Peranen, and K. Simons. 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature.* 378:96–98.
- Scheiffele, P., M.G. Roth, and K. Simons. 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J.* 16:5501–5508.
- Schell, M.J., M. Maurice, B. Stieger, and A.L. Hubbard. 1992. 5' nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J. Cell Biol.* 119:1173–1182.
- Shin, K., S. Straight, and B. Margolis. 2005. PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J. Cell Biol.* 168:705–711.
- Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387:569–572.
- Song, W., G. Apodaca, and K. Mostov. 1994. Transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor is regulated in multiple intracellular compartments. *J. Biol. Chem.* 269:29474–29480.
- Sugimoto, H., M. Sugahara, H. Folsch, Y. Koide, F. Nakatsu, N. Tanaka, T. Nishimura, M. Furukawa, C. Mullins, N. Nakamura, et al. 2002. Differential recognition of tyrosine-based basolateral signals by AP-1B subunit mu1B in polarized epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 13:2374–2382.
- Sun, A.Q., M. Ananthanarayanan, C.J. Soroka, S. Thevananthar, B.L. Shneider, and F.J. Suchy. 1998. Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 275:G1045–G1055.
- Wandinger-Ness, A., M.K. Bennett, C. Antony, and K. Simons. 1990. Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J. Cell Biol.* 111:987–1000.
- Zurzolo, C., and E. Rodriguez-Boulant. 1993. Delivery of Na⁺,K⁺-ATPase in polarized epithelial cells. *Science.* 260:550–552.
- Zurzolo, C., A. Le Bivic, A. Quaroni, L. Nitsch, and E. Rodriguez-Boulant. 1992. Modulation of transcytotic and direct targeting pathways in a polarized thyroid cell line. *EMBO J.* 11:2337–2344.

2- Ruolo della glicosilazione nello smistamento apicale e nell'oligomerizzazione di proteine GPI ancorate.

I risultati di questo studio sono descritti brevemente in questa sezione e in maniera approfondita nel lavoro annesso alla tesi che è in fase di revisione.

Problematica

L'oligomerizzazione in complessi ad alto peso molecolare di proteine ad ancora GPI che avviene concomitantemente alla loro associazione a rafts lipidici, è un requisito fondamentale per il loro smistamento alla superficie apicale di cellule epiteliali polarizzate (Paladino *et al.*, 2004). Il meccanismo per cui proteine GPI apicali oligomerizzano e la natura di queste interazioni resta sconosciuto. Una volta formati, gli oligomeri sono insensibili alla deplezione di colesterolo e sono resistenti alle condizioni in cui i DRMs sono distrutti, indicando che l'oligomerizzazione dipende da interazioni proteina-proteina. Complessi ad alto peso molecolare (HMW) di PLAP sono sensibili alla temperatura, ma non ad agenti riducenti (Paladino *et al.*, 2004).

La glicosilazione dell'ectodominio proteico potrebbe essere un buon candidato per mediare questo tipo di interazioni. Infatti la glicosilazione ha un ruolo importante nel ripiegamento delle proteine e nella loro oligomerizzazione (Hurtley and Helenius, 1989) e sia la *N*- che la *O*- glicosilazione sono state implicate nello smistamento apicale di proteine di membrana (Rodriguez-Boulan and Gonzalez, 1999). Tuttavia il ruolo di questa modifica post-traduzionale nell'indirizzare le proteine al corretto polo cellulare resta da chiarire.

Per analizzare se i glicani siano coinvolti nell'oligomerizzazione delle GPI-APs e

conseguentemente nel loro smistamento apicale, in questo lavoro abbiamo studiato il “sorting”, l’associazione a DRMs e l’abilità di formare oligomeri di due proteine GPI ancorate e dei loro mutanti di glicosilazione. I nostri dati indicano che la glicosilazione dell’ectodominio proteico delle proteine ad ancora GPI può avere un ruolo indiretto nel guidare il loro smistamento e la loro capacità di oligomerizzare. Un ipotetico interattore *N*-glicosilato e rafts-associato potrebbe invece essere coinvolto nell’oligomerizzazione e nello smistamento apicale di GPI-APs.

Risultati.

Per chiarire rispettivamente il ruolo della *N*- e *O*- glicosilazione nell’oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI, abbiamo analizzato due proteine native GPI, una *N*- (PLAP) e una *O*-glicosilata (p75GPI) e i loro mutanti di glicosilazione in cellule MDCK.

Grazie a un saggio di biotilazione di superficie selettiva ed analisi mediante microscopia confocale effettuate su cellule cresciute su filtro completamente polarizzate, risulta che tutte le proteine, glicosilate o meno, sono correttamente smistate alla membrana apicale.

Affinchè le GPI-APs siano correttamente localizzate alla superficie cellulare, queste devono associarsi a rafts e oligomerizzare. Per capire se la mancanza dei glicani possa alterare l’affinità delle proteine per i DRMs, abbiamo purificato le differenti proteine mediante centrifugazione all’equilibrio su un gradiente di saccarosio. Da quest’analisi emerge che la glicosilazione non influenza l’abilità delle proteine ad associarsi a rafts lipidici. Inoltre, dalla purificazione delle proteine su “velocity gradients”, risulta che sia la *N*- che la *O*-glicosilazione non hanno un ruolo diretto nel promuovere l’oligomerizzazione delle proteine

GPI ancorate in complessi HMW.

Tuttavia, in presenza di tunicamicina, un inibitore della *N*-glicosilazione, e in condizioni di deplezione di colesterolo, PLAP è smistata in maniera non polarizzata alla superficie cellulare e non è più in grado di formare complessi ad alto peso molecolare.

Questi dati suggeriscono che i residui di glicosilazione sull'ectodominio della proteina non sono direttamente coinvolti nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale delle GPI-APs, ma piuttosto un fattore *N*-glicosilato e rafts associato sembra essere coinvolto nella stabilizzazione degli oligomeri nei rafts e nel loro indirizzamento al polo apicale delle cellule.

Conclusioni

L'ipotesi dei rafts-lipidici per lo smistamento apicale di proteine GPI ancorate (van Meer and Simons, 1988) è stata recentemente rivisitata da dati ottenuti nel nostro laboratorio che mostrano il ruolo centrale dell'oligomerizzazione di proteine GPI ancorate (Paladino *et al.*, 2004).

In questo lavoro abbiamo analizzato il ruolo della glicosilazione nella formazione degli oligomeri.

Perturbazioni della *O*- e /o *N*- glicosilazione portano ad uno smistamento non polarizzato di varie proteine di membrana (Kitagawa *et al.*, 1994; Yeaman *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 2000; Martinez-Maza *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004). Il "sorting" di altre proteine, invece, non è modificato dall'assenza della glicosilazione (Marzolo *et al.*, 1997; Larsen *et al.*, 1999; Meerson *et al.*, 2000; Potter *et al.*, 2004). Per chiarire il ruolo degli zuccheri, quindi, in questo lavoro abbiamo analizzato le proprietà di due proteine GPI native, una *N*- e una *O*-glicosilata e dei loro mutanti di glicosilazione.

Abbiamo trovato che gli zuccheri non influenzano il corretto smistamento delle proteine alla membrana apicale in cellule polarizzate, la loro capacità di associarsi a rafts e la loro abilità ad aggregarsi in complessi ad alto peso molecolare. Solo quando le cellule sono cresciute in presenza di un inibitore della glicosilazione e in condizioni di deplezione di colesterolo, PLAP è smistata in maniera non polarizzata e non è più capace di oligomerizzare.

Due modelli sono stati proposti per descrivere il meccanismo per cui i glicani possono guidare la segregazione delle proteine in vescicole apicali (Rodriguez-Boulant and Gonzalez, 1999). Nel primo modello le proteine sono smistate apicalmente grazie ad una famiglia di recettori che possono riconoscere direttamente gli *N*- e *O*-glicani. Nel secondo modello gli zuccheri hanno un ruolo nel facilitare lo smistamento apicale stabilizzando una conformazione proteica richiesta per l'uscita dal TGN.

I dati ottenuti dalle mie analisi mi hanno portato a proporre un modello alternativo per spiegare l'incorporazione di GPI-APs in vescicole apicali in grado di riconciliare i due modelli precedentemente descritti. La *N*-glicosilazione dell'ectodominio proteico potrebbe avere un ruolo importante nello stabilizzare la conformazione proteica delle proteine. Tuttavia è piuttosto la glicosilazione di un putativo interattore presente nei rafts lipidici ad essere necessario per il riconoscimento e l'oligomerizzazione delle GPI-APs e che porta alla loro inclusione in vescicole apicali.

Ulteriori studi (vedi anche risultati 4) sono tuttavia necessari per identificare questo recettore apicale e il meccanismo molecolare dell'interazione responsabile della formazione di oligomeri.

LAVORO n. 2:

“N- and O- glycans are not directly involved in the oligomerization and apical sorting of GPI anchored proteins.”

Catino MA, Paladino S, Tivodar S, Pocard T, Zurzolo C. *Submitted to Traffic.*

***N*- and *O*- glycans are not directly involved in the oligomerization and apical sorting of GPI-anchored proteins.**

Maria Agata Catino^{†§#}, Simona Paladino^{§‡#}, Simona Tivodar[§], Thomas Pocard[†] and Chiara Zurzolo^{§†*}

[§]Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università degli Studi di Napoli Federico II, 80131 Napoli, Italy; [‡]CEINGE Biotecnologie Avanzate S.C.A.R.L., 80145 Napoli, Italy; [†]Unité de Trafic Membranaire et Pathogénèse, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

Running Title: Oligomerization and apical sorting of GPI-APs

Key words: Oligomerization, apical sorting, glicosilfosfatidilinositol, polarization, glycosylation, PLAP, p75GPI.

These authors contributed equally to this work.

*Address correspondence to Chiara Zurzolo, Unité de Trafic Membranaire et Pathogénèse, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33 (0)1 45688277. Fax: +33 (0)1 40613238. E-mail: zurzolo@pasteur.fr; zurzolo@unina.it

Abstract

Oligomerization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-AP) into high molecular weight (HMW) complexes is an essential step for their apical sorting in polarized epithelial cells. However the mechanism by which apical GPI-APs oligomerize is still unclear. To investigate the possible role of *N*- and *O*- glycosylation here we analyzed behaviour of two glycosylated GPI anchored apical proteins, p75GPI and PLAP, and of their glycosylation mutants. We found that like the wt proteins both the *N*- and *O*- glycosylation mutants are apically sorted, associate to DRMs and are able to oligomerize in MDCK cells suggesting that glycosylation do not have a direct role in GPI-APs oligomerization and apical sorting. Interestingly, when cells are depleted of cholesterol and treated with tunicamycin, PLAP is not able to oligomerize and is missorted to the basolateral surface, thus supporting an indirect role of *N*-glycosylation, possibly mediated by a putative rafts-associated interactor.

Introduction

It has been proposed that in polarized epithelial cells the GPI anchor works as a signal for the apical localization of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs) (1, 2) by mediating their association with sphingolipid- and cholesterol-rich

microdomains (rafts) (3, 4), which was assayed by their insolubility in cold detergents (from where derive their name of detergent resistant microdomains or DRMs) (1, 3, 5).

However, it has been recently shown that both apical and basolateral GPI-APs are associated with DRMs indicating that association to these domains is not sufficient to determine apical sorting (6-8). In contrast, only apical GPI-APs form high molecular weight (HMW) complexes and when oligomerization is impaired they are missorted in an unpolarized fashion (7). Furthermore, because oligomerization occurs concomitantly with DRM-association during their transport to the plasma membrane, we have proposed that stabilization of GPI-APs into rafts, promoted by their oligomerization (which most likely could induce the coalescence of more rafts) is the key step for apical sorting of GPI-APs (7, 9).

Nonetheless, the mechanism by which apical GPI-APs oligomerize is still unclear. Specifically, it is not known what does oligomerization depends on, and/or what is the nature of the interactions determining the apical GPI-APs clustering prior to apical sorting.

The fact that once formed oligomers are insensitive to depletion of cholesterol and they are resistant to conditions (e.g., SDS extraction) in which DRMs are disrupted (7) suggests that once formed oligomers depend on protein-protein interactions. Indeed, in the case of GFP-GPI we found that oligomerization is stabilized by disulphide bonds between the protein ectodomains (7). However, for native GPI-APs most likely non-covalent interactions between protein ectodomains will be responsible of oligomers formation. Weak interactions could be formed and broken easily than covalent interactions reflecting the rapid dynamics to which proteins are subjected in the membrane. The fact that HMW complexes of placental alkaline phosphatase (PLAP) are sensitive to heat, but not to reducing agents (7) supports this possibility. Hence, post-translational modifications of protein ectodomains could be involved in proteins oligomerization. Among these glycosylation determinants of protein ectodomains could facilitate weak interactions therein and therefore could be suitable candidates.

Furthermore, protein glycosylation occurring in the ER and Golgi has an important role in protein folding and oligomerization (10), and both *N*- and *O*-glycosylation have been implicated in apical targeting (11). An *O*-glycan-rich stalk region of the neurotrophin receptor p75^{NTR} is necessary for accurate apical delivery of this protein in a heterologous MDCK expression system (12). Inhibition of *O*-glycosylation using pharmacological approaches perturbs also the apical sorting of DPPIV, MUC1, carcinoembryonic antigen and CD44 (13, 14). Impairment of *N*-glycosylation by drugs impairs the apical secretion of gp80 and of erythropoietin (15, 16). Gp114 is mistargeted basolaterally in ricin-

resistant cells (17). *N*-glycosylation is involved also in apical localization of neuronal glycine transporter GLYT2, DPPIV, endolyn and membrane dipeptidase (18-22). Addition of *N*-linked glycans to nonglycosylated proteins results in efficient apical secretion of the glycosylated rat growth hormone (gGH), GPI-anchored gGH, truncated occludin, and ERGIC-53 chimera (6, 23, 24).

In contrast to these data it has been shown that some apical soluble secretory proteins are insensitive to *N*-glycan removal (25). Similarly *N*-glycans are not required for the sorting of influenza virus hemagglutinin (26), hepatitis B surface antigen and osteopontin in MDCK cells (27, 28). On the same line O-glycosylated stalk region is a necessary, but not sufficient component of the apical sorting signal of sucrase isomaltase (SI) because in this case the membrane anchoring domain is also required (29, 30).

Here we wanted to understand whether glycans were involved in the mechanism of oligomerization of GPI-APs and consequently in their apical sorting. To address this question we compared the sorting, rafts association and ability to form oligomers of two GPI anchored proteins and their glycosylation mutants. We used PLAP, which is *N*-glycosylated and p75GPI, the GPI-anchored version of the human neurotrophin receptor p75^{NTR} (8), which contain a large O-glycosylated stalk and one *N*-glycosylation site. Interestingly, in the case of the transmembrane form, p75^{NTR}, which possess both *N*- and O-oligosaccharide chains, the O-glycosylation but not the *N*-glycans are required for its apical sorting (12, 31).

We found that both p75GPI and PLAP and their glycosylation mutants are apically localized in polarized MDCK cells, associate with DRMs and are able to form HMW complexes. These data indicate that both *N*- and O-glycosylation are not involved in the oligomerization and apical sorting of GPI-APs. However, in conditions of cholesterol depletion and tunicamycin treatment PLAP is not able to oligomerize and is missorted to the basolateral surface. The fact that while site direct mutagenesis of *N*-glycosylation sites does not interfere with apical sorting of GPI-APs, but the tunicamycin treatment does, indicate that *N*-glycosylation might have an indirect effect on GPI-APs apical sorting and that an hypothetic *N*-glycosylated and raft-associated interactor could be involved.

Results

Site direct mutagenesis of *N*- and O-glycosylation sites of GPI-APs does not impair their apical sorting.

In order to study the role of glycosylation in the apical sorting of GPI-APs, we used the placental alkaline phosphatase (PLAP), a native GPI-AP with two *N*-glycosylated sites and p75GPI, a GPI anchored version of the neurotrophin receptor p75^{NTR}, in which the protein ectodomain, which is both O- and *N*-glycosylated, is fused to the GPI attachment signal of PLAP (8). Interestingly it was shown that a mutant of the transmembrane p75^{NTR} lacking the

juxtamembrane O-glycosylated region is missorted to the basolateral plasma membrane, indicating that the O-glycosylated stalk domain is required for the apical sorting of the native transmembrane receptor (12, 31).

By site-directed mutagenesis of the glycosylation sites we produced PLAP Δ N which lacks both *N*-glycosylation sites and p75 Δ OGPI which lacks the O-glycosylated stalk (Fig. 1).

Both PLAP Δ N and p75 Δ OGPI mutants were stably transfected in MDCK cells and several clones expressing comparable levels of proteins (which migrate on the gel faster than wild-type proteins) were selected (Fig. 1).

To determine the surface polarity of these proteins, we performed both confocal microscopy analysis (Fig. 2A) and a selective biotinylation assay (Fig. 2B) on filter grown polarized MDCK cells. Both p75GPI and its O-glycosylation mutant p75 Δ OGPI resulted apically sorted (Fig. 2 A and B). Similarly, the majority of PLAP Δ N was still apical (80-85%), with a little missorting to the basolateral surface compared to the wt protein (Fig. 2 A and B). Therefore, these data indicate that neither *N*- or O-glycosylation are required for apical sorting of GPI-APs.

N- and O-glycosylation mutant proteins are DRM associated and are able to oligomerize.

It has been postulated that in order to be apically sorted GPI-APs require to associate to DRMs and to oligomerize within. In order to understand whether lacking of *N*- or O-glycans could alter the partition of the proteins in DRMs we purified the different proteins by centrifugation to equilibrium on sucrose density gradients after extraction of the cells in TX-100 at 4°C (Fig. 3). As previously shown (31), we found that the transmembrane p75^{NTR} did not associate with DRMs. In contrast, p75GPI and p75 Δ OGPI floated in similar amounts (about 40%) to the lighter fractions of the gradients where the ganglioside GM1 was enriched. We obtained similar results also for PLAP and PLAP Δ N which floated into DRMs at similar extent (Fig. 3). Therefore, we could conclude that glycosylation does not influence the ability of GPI anchored proteins to associate with DRMs, which most likely depends on the natural affinity of GPI anchor for these lipid microdomains as previously suggested (6-9).

Next, to determine whether glycosylation plays a role in promoting oligomerization of GPI-APs, we purified the different proteins on velocity gradients where they sediment according to their molecular weight (7, 32, 33). We found that while p75^{NTR} was purified almost exclusively as monomeric and dimeric complex as previously shown (31), its GPI anchored version, p75GPI, was present for about 30% in high molecular weight complexes (HMW) containing more than a trimer (Fig. 4A). These results confirmed that oligomerization is a specific requirement for apical GPI-APs, but not for transmembrane non-rafts associated proteins (9). Interestingly, we also found that p75 Δ OGPI was present in HMW complexes even in higher percentage compared to the wt protein (about 60%) (Fig. 4A). This indicates that p75^{NTR} O-glycosylation is not required for its oligomerization, on the contrary it appears that removal of O-linked

sugars from the protein ectodomain favours its ability to oligomerize.

In the case of *N*-glycans, we found that PLAP Δ N oligomerizes slightly less (~30-35%) compared to the wt protein (~45%) (Fig. 4B). This mild phenotype may indicate that also *N*-glycans do not have a direct role in promoting GPI-APs clustering. In order to confirm this hypothesis we decided to analyze the sorting of the p75 *N*-glycosylation mutant (see below). Indeed although the transmembrane p75^{NTR} lacking the *N*-linked sugars is correctly sorted to the apical membrane domain in polarized MDCK cells (12), it was possible that this *N*-glycosylation was the determinant factor for oligomerization and apical sorting of the GPI version of p75^{NTR}. To this aim we constructed and stably transfected in MDCK cells two additional p75GPI mutants: p75 Δ NGPI in which only the *N*-glycosylation site, Asn 32, was mutated in glutamine, and p75 Δ N Δ OGPI which lacks both *N*- and *O*-glycosylation sites (Fig. 5A). By confocal microscopy and biotinylation assays on filter grown MDCK cells we observed that both mutants were apically delivered to the plasma membrane (Fig. 5B). Furthermore, both p75 Δ NGPI and p75 Δ N Δ OGPI floated to the DRM-fractions (about 30%) on sucrose density gradients (Fig. 5C) and were found in oligomers containing more than a trimer (respectively for about 40% and 50%) (Fig. 5D).

All together, these data indicate that neither the *O*-, or the *N*-glycosylation, alone or combined, act as determinant for apical sorting of GPI-APs.

Combined treatment of tunicamycin and cholesterol depletion affects sorting and oligomerization of PLAP.

Although glycosylation of the protein ectodomain does not seem to affect directly their capacity to oligomerize and thus to be apically sorted, we observed that PLAP Δ N oligomerized a bit less and was also slightly missorted compared to the wt protein (see Fig. 2B and 4B). This result points towards a certain involvement of *N*-glycans in GPI-APs apical sorting. To further investigate this possibility we analyzed the effect of tunicamycin, a specific inhibitor of *N*-glycosylation, on the sorting and on the ability of PLAP to oligomerize.

In order to analyze exclusively the protein synthesized in the presence of this compound, cells grown on filters were treated with tunicamycin for 15 hrs, pulsed for 15 min with ³⁵S-methionine and chased for 90 and 120 min (respectively corresponding to the maximum arrival of the protein to the surface and to its initial decrease) prior to surface biotinylation (Fig. 6).

In these conditions PLAP was still apically sorted (Fig. 6A), however there was a little decrease in PLAP oligomerization (Fig. 6B). Because oligomerization and raft-association concur to apical sorting of GPIAPs, we treated the cells with cholesterol depleting agents (mevinolin and methyl- β -cyclodextrin (β CD) and with tunicamycin for 15 hrs and then pulsed their for 15 min with ³⁵S-methionine. After a chase of 40 min (time necessary for the protein to reach medial cisternae of Golgi apparatus), cells were lysed and purified on velocity gradients. Interestingly, the combined treatment of tunicamycin

and cholesterol depletion inhibits leads to PLAP missorting (Fig. 6A) and strongly reduces its oligomerization (Fig. 6B).

These results suggest that *N*-glycosylation and rafts association concur in promoting GPI-APs oligomerization and apical sorting. Because the site directed mutagenesis does not affect the sorting of the protein, we propose that the *N*-glycosylation of a putative raft-associated factor may be important for the oligomerization and correct sorting of GPI-APs.

Discussion

The lipid-rafts hypothesis for GPI-APs apical sorting (3, 34), was refined in 2004 by Paladino et al. (7), which showed that clustering of GPI-APs is also necessary. Oligomerization of apical GPI-APs begins in the medial Golgi, is dependent on protein-protein interactions and its impairment leads to protein missorting (7). HMW complexes are sensitive to heat but not to reducing agents and seem depend on homotypic interactions (7), however the mechanism of oligomerization is not known.

In this paper we have analyzed the possible role of glycosylation on GPI-APs oligomerization and apical sorting. Glycosylation has an important role in protein folding and in protein aggregation (10) and in apical targeting (11). Specifically, *N*- and *O*-glycans have been reported to act as apical sorting signals for some transmembrane proteins (6, 12, 22, 23) and for certain secretory proteins (24). However, nonglycosylated secretory and membrane proteins apically sorted have been identified (25, 35, 36) and disruption of *N*-glycosylation does not alter the polarized distribution of several proteins (27, 28, 37-40). Furthermore, a GPI-anchored mutant of endolyn showed that tunicamycin treatment did not disrupt apical delivery of the protein in MDCK cells (22).

Here we focused on two GPI-APs, PLAP and p75GPI and their *N*- and *O*-glycosylation mutants. By confocal microscopy and biotinylation assay we found that both p75GPI and PLAP are apically localized when transfected in MDCK cells. Moreover, differently to the transmembrane p75^{NTR} (31) both proteins floated in the lighter fractions on sucrose density gradients and are able to form HMW complexes, confirming our GPI-APs sorting model (7). However, differently from the transmembrane form, where the *O*-glycosylated stalk is essential for its apical sorting, p75GPI lacking the *O*-glycosylated stalk (p75 Δ OGPI) was still apically sorted, associated to DRMs and oligomerized even more than the wt form (Fig. 2, 3 and 4). This supports the hypothesis that DRM and non DRM-associated p75 forms are recognized and sorted apically by different mechanisms and that only in the case of the transmembrane, non-rafts associated protein, the *O*-glycosylated stalk is important (7, 12, 31). Remarkably, also the *N*-glycosylation mutant of PLAP, PLAP Δ N, was still apically sorted DRM-associated and partially oligomeric. Thus these data indicate that both *N*-

and O- glycans are not directly involved in the apical sorting of GPI-APs.

Recently it has been described a concerted role for both N- and O-glycans in the apical sorting of dipeptidylpeptidase IV (DPPIV), an endogenous, raft-associated transmembrane protein in Caco-2 cells (41). Because p75 possess also one N-glycosylation site and because the O-glycosylation mutant oligomerizes more than the wt protein, in order to rule out a role for N-glycosylation in the oligomerization of p75GPI, we analyzed the behaviour of a double glycosylation mutant for both O- and N-glycans (p75 Δ N Δ OGPI) and a single mutant lacking only the N-glycosylation site (p75 Δ NGPI). Also these mutant proteins were apically sorted, associated to DRMs and were able to oligomerize. The fact that p75 Δ N Δ OGPI and p75 Δ OGPI oligomerize more than the wt protein, could be explained by the fact that suppression of the large O-glycosylated stalk resulted in the aggregation or misfolding of proteins as glycans are known to make the folding intermediates more soluble and prevent aggregation (42).

Interestingly, we observed that PLAP Δ N oligomerize less in comparison to the wt protein and it is also partially missorted indicating that N- glycans could have an indirect role on GPI protein oligomerization and apical sorting.

Two models have been proposed to describe the mechanism by which glycans may enable segregation of proteins into apically destined carriers (11). In the first model proteins are sorted into apically destined vesicles by a family of receptors that could recognize N- and O-glycans directly. In the other proposed mechanism glycans facilitate apical sorting by stabilizing a proteinaceous conformation required for TGN export.

To better understand the real contribution of N-glycans to apical sorting of GPI-APs, we treated cells expressing PLAP and PLAP Δ N with tunicamycin. While the tunicamycin treatment alone did not affect apical sorting of PLAP (Fig. 6A), when cells were treated with tunicamycin and concomitantly depleted of cholesterol, both PLAP and PLAP Δ N (data not shown) were not able to oligomerize and were missorted (Fig. 6A and B). This data argue for an indirect role of glycosylation on apical sorting of GPI-APs and possibly for the involvement of a proteinaceous DRM-associated N-glycosylated interactor. This hypothesis is supported by the finding that protein oligomerization results to be drastically impaired only when cells are treated with tunicamycin but not when proteins are mutated in their N- glycosylation sites by site direct mutagenesis.

To date, a variety of potential apical receptors has been discussed. One of them, the vesicular integral protein (VIP36) was demonstrated to be involved in early trafficking steps, from the ER to the Golgi apparatus and may not represent an essential sorting factor for apical proteins (43-45). Another candidate, the VIP17/MAL protein, is present in lipid rafts and has been shown to be required for apical delivery of some, but not all GPI-APs (46, 47). Furthermore, this protein is not glycosylated and is necessary also for the apical transport of

transmembrane proteins independently from their raft association (46-48). Therefore, it does not seem to be the specific factor involved in GPI-APs oligomerization and apical sorting. Last but not least it has been shown that depletion of galectin-4 by RNA interference impairs rafts formation and affects apical trafficking of transmembrane and GPI anchored raft-associated proteins (49). Galectin-4 interacts with high affinity with glycosphingolipids, in particular with the sulfatides with long chain-hydroxylated fatty acids, which are specifically enriched in lipid rafts of HT-29 cells. It has been proposed that binding to sulfatides and galactosylceramide galectin-4 would cross-link rafts to leads to generation of transport carriers (49). However, because raft partitioning alone is not sufficient for apical delivery of GPI-APs, another scaffolding mechanisms would be involved.

Here we propose an alternative model for the incorporation of GPI-APs in apical vesicles that could reconcile the two models already proposed (11). We believe that N-glycans on the protein ectodomain may be important to stabilize the proteinaceous conformation of the protein. However, it appears that a putative interactor present in lipid rafts, possibly N-glycosylated, may be necessary for the recognition and oligomerization of GPI-APs which leads to their inclusion in apical vesicles. Further studies are necessary to clearly identify this apical receptor and the molecular mechanism of this interaction for oligomers formation.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen. Antibodies anti-PLAP were purchased from Rockland Biosciences and antibodies anti-p75 were gifts from A. Le Bivic (Faculté des Sciences de Luminy, Marseille, France). Biotin and streptavidin beads were obtained from Pierce Chemical Co. HRP-linked antibodies and streptavidin were purchased from GE Healthcare. All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfections

MDCK cells were grown in DMEM containing 5% FBS. MDCK cells were transfected with cDNA coding for the different proteins with lipofectin (Invitrogen). The p75GPI construct was a gift from Dr. A. Le Bivic (50). The p75 Δ OGPI construct was designed by fusing in frame the ectodomain of p75^{NTR} lacking the O-glycans stalk (gift from Dr. A. Le Bivic (12)) with the GPI attachment signal of PLAP and inserted in pcB6 expression vector. Stable clones were selected by resistance to neomycin. PLAP expressing cells were obtained previously (7).

Site-directed mutagenesis

All N-glycosylation mutants were obtained by site-directed mutagenesis using the QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The oligonucleotides used to mutate the two N-

glycosylation sites of PLAP were: 141asn5' (5'-CGCTTTAACCAGTGCCAGACGACGCGGCAAC-3') and 141asn3' (5'-GTTGCCGCGTGTCTGTCGCACTGGTTAAAGCG-3') to change asn 141 in gln and 271asn5' (5'-GCCCCGTACGTGTGGCAGCGCACTGAGCTCATG-3') and 271asn3' (5'-CATGAGCTCAGTGCGCTGCCACACGTACCGGGC-3') to change asn 271 in gln. The double mutant was obtained using as template the cDNA containing the 141 mutation for a second round of mutagenesis to introduce the other mutation. The oligonucleotides used to mutate the *N*-glycosylation site of p75GPI and of p75ΔOGPI were: N32Q5' (5'-GCCCAGCCTTGTGGAGCCCAGCAGACCGTGTGTGAGCCC-3') and N32Q3' (5'-GGGCTCACACACGGTCTGCTGGGCTCCACAAGGCTGGGC-3') to change asn 32 in gln.

Fluorescence microscopy

MDCK cells were grown on transwell filters for 3–4 d, washed with PBS containing CaCl₂ and MgCl₂, fixed with 4% PFA, and quenched with 50 mM NH₄Cl. Cells were permeabilized with 0.075% saponin. Primary antibodies were detected with TRITC-conjugate secondary antibodies. Images were collected using a laser scanning confocal microscope (LSM 510; Carl Zeiss MicroImaging, Inc.) equipped with a planapo 63x oil-immersion (NA 1.4) objective lens.

Biotinylation assay

Cells grown on transwell filters were selectively biotinylated and processed as described previously (51). Lysates were immunoprecipitated with specific antibodies and run on SDS-PAGE. Biotinylated proteins were revealed by HRP-conjugated streptavidin. In targeting experiments, after immunoprecipitation with a specific antibody, proteins were re-precipitated with streptavidin beads, separated on SDS-PAGE and revealed by fluorography.

Sucrose density gradients

Sucrose gradient analysis of TX-100-insoluble material was performed using previously published protocols (52, 53). Cells, grown on 150 mm (20–25 x 10⁶) dishes to confluence, were scraped from dishes in PBS containing CaCl₂ and MgCl₂, resuspended in 1 ml of lysis buffer containing 1% TX-100, 10 mM Tris buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and sheared through a 23-g needle. The lysate was mixed with an equal volume of 85% sucrose and run on discontinuous sucrose gradients (40–5%) at 200,000 g for 17 hrs at 4°C. Fractions were collected starting from the top of the tube and TCA-precipitated. Samples were revealed by western blotting using specific antibodies. To reveal the distribution of GM1 in the gradient 30 µl of each fraction (before TCA precipitation) were spotted on nitrocellulose filters and detected with HRP-conjugated cholera toxin B subunit (Sigma-Aldrich).

Velocity gradients

Velocity gradients were performed using previously published protocols (7, 32, 33). Cells were grown to

confluency in 100 mm dishes, washed in PBS containing CaCl₂ and MgCl₂ and lysed on ice for 30 min in 20 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 0.4% SDS, 0.2% TX-100. Lysates were scraped from dishes, sheared through a 26-g needle and layered on top of a glycerol gradient (40–20%) after nuclei pelleting. After centrifugation at 45,000 rpm for 16 h in an ultracentrifuge (model SW50; Beckman Coulter), fractions of 300 µl were harvested from the top of the gradient and TCA precipitated or immunoprecipitated depending on the experiment. Proteins were revealed by Western blotting using specific antibodies.

Pulse chase

Cells grown in 100 mm dishes or on filter were starved of methionine and cysteine for 45 h, and pulse labeled for 15 min with medium containing 100 µCi/ml of Pro-mix ³⁵S-cell labeling (Amersham Biosciences) and incubated in chase medium (DMEM containing 5% FBS and met/cys 10x) for different times.

Cholesterol depletion

To deplete the cells of cholesterol we adapted a previously described protocol (8, 54). Briefly MDCK cells were plated on filters and mevlinolin (15 µM) was added to the cells 32 h after plating in DME supplemented with 5% delipidated calf serum and mevalonate (250 µM). After 4 days in culture (62 h of this treatment), βCD (10 mM) was added in medium containing 20 mM Hepes, pH 7.5, and 0.2% bovine albumin for 1 h at 37°C. To determine the rate of cholesterol depletion we measured cholesterol cellular levels by a colorimetric assay. In brief, cells were washed twice with PBS containing CaCl₂ and MgCl₂, lysed with appropriate lysis buffer and infinity cholesterol reagent (Sigma-Aldrich) was added to the lysates in the ratio 1:10. Absorbance of samples was read at 550 nm.

Acknowledgments:

We thank Dr André Le Bivic for generous gifts of anti-p75 antibodies. This work was supported by grants from the Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (FIRB 2003 and PRIN 2004) and from ANR (05-BLAN 296-01).

References

1. Brown DA, Crise B, Rose JK. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 1989;245(4925):1499-1501.
2. Lisanti MP, Sargiacomo M, Graeve L, Saltiel AR, Rodriguez-Boulan E. Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(24):9557-9561.
3. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387(6633):569-572.

4. Simons K, van Meer G. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 1988;27(17):6197-6202.
5. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992;68(3):533-544.
6. Benting JH, Rietveld AG, Simons K. N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 1999;146(2):313-320.
7. Paladino S, Sarnataro D, Pillich R, Tivodar S, Nitsch L, Zurzolo C. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 2004;167(4):699-709.
8. Lipardi C, Nitsch L, Zurzolo C. Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol Biol Cell* 2000;11(2):531-542.
9. Paladino S, Sarnataro D, Tivodar S, Zurzolo C. Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins. *Traffic* 2007;8(3):251-258.
10. Hurtley SM, Helenius A. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 1989;5:277-307.
11. Rodriguez-Boulan E, Gonzalez A. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* 1999;9(8):291-294.
12. Yeaman C, Le Gall AH, Baldwin AN, Monlauzeur L, Le Bivic A, Rodriguez-Boulan E. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 1997;139(4):929-940.
13. Gouyer V, Leteurtre E, Delmotte P, Steelant WF, Krzewinski-Recchi MA, Zanetta JP, Lesuffleur T, Trugnan G, Delannoy P, Huet G. Differential effect of GalNAc α -O-bn on intracellular trafficking in enterocytic HT-29 and Caco-2 cells: correlation with the glycosyltransferase expression pattern. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 8):1455-1471.
14. Huet G, Hennebicq-Reig S, de Bolos C, Ulloa F, Lesuffleur T, Barbat A, Carriere V, Kim I, Real FX, Delannoy P, Zweibaum A. GalNAc- α -O-benzyl inhibits NeuAcalpha2-3 glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells. *J Cell Biol* 1998;141(6):1311-1322.
15. Kitagawa Y, Sano Y, Ueda M, Higashio K, Narita H, Okano M, Matsumoto S, Sasaki R. N-glycosylation of erythropoietin is critical for apical secretion by Madin-Darby canine kidney cells. *Exp Cell Res* 1994;213(2):449-457.
16. Urban J, Parczyk K, Leutz A, Kayne M, Kondor-Koch C. Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol* 1987;105(6 Pt 1):2735-2743.
17. Le Bivic A, Garcia M, Rodriguez-Boulan E. Ricin-resistant Madin-Darby canine kidney cells mis-sort a major endogenous apical sialoglycoprotein. *J Biol Chem* 1993;268(10):6909-6916.
18. Ihrke G, Bruns JR, Luzio JP, Weisz OA. Competing sorting signals guide endolyn along a novel route to lysosomes in MDCK cells. *EMBO J* 2001;20(22):6256-6264.
19. Martinez-Maza R, Poyatos I, Lopez-Corcua B, E Nu, Gimenez C, Zafra F, Aragon C. The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 2001;276(3):2168-2173.
20. Naim HY, Joberty G, Alfalah M, Jacob R. Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 1999;274(25):17961-17967.
21. Pang S, Urquhart P, Hooper NM. N-glycans, not the GPI anchor, mediate the apical targeting of a naturally glycosylated, GPI-anchored protein in polarised epithelial cells. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 21):5079-5086.
22. Potter BA, Ihrke G, Bruns JR, Weixel KM, Weisz OA. Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 2004;15(3):1407-1416.
23. Gut A, Kappeler F, Hyka N, Balda MS, Hauri HP, Matter K. Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J* 1998;17(7):1919-1929.
24. Scheiffele P, Peranen J, Simons K. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 1995;378(6552):96-98.
25. Su T, Cariappa R, Stanley K. N-glycans are not a universal signal for apical sorting of secretory proteins. *FEBS Lett* 1999;453(3):391-394.
26. Green RF, Meiss HK, Rodriguez-Boulan E. Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 1981;89(2):230-239.
27. Marzolo MP, Bull P, Gonzalez A. Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(5):1834-1839.
28. Trischler M, Koch-Brandt C, Ullrich O. Apical transport of osteopontin is independent of N-glycosylation and sialylation. *Mol Membr Biol* 2001;18(4):275-281.
29. Jacob R, Alfalah M, Grunberg J, Obendorf M, Naim HY. Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J Biol Chem* 2000;275(9):6566-6572.
30. Alfalah M, Jacob R, Preuss U, Zimmer KP, Naim HY. O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol* 1999;9(11):593-596.
31. Breuza L, Garcia M, Delgrossi MH, Le Bivic A. Role of the membrane-proximal O-glycosylation

- site in sorting of the human receptor for neurotrophins to the apical membrane of MDCK cells. *Exp Cell Res* 2002;273(2):178-186.
32. Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM. A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4456-4469.
 33. Scheiffele P, Verkade P, Fra AM, Virta H, Simons K, Ikonen E. Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 1998;140(4):795-806.
 34. van Meer G, Simons K. Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 1988;36(1):51-58.
 35. Alonso MA, Fan L, Alarcon B. Multiple sorting signals determine apical localization of a nonglycosylated integral membrane protein. *J Biol Chem* 1997;272(49):30748-30752.
 36. Kuhn U, Cohn DV, Gorr SU. Polarized secretion of the regulated secretory protein chromogranin A. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270(2):631-636.
 37. Bravo-Zehnder M, Orio P, Norambuena A, Wallner M, Meera P, Toro L, Latorre R, Gonzalez A. Apical sorting of a voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel α -subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(24):13114-13119.
 38. Jurczyk J, Brown D, Stanley KK. Polarised secretion of cytokines in primary human microvascular endothelial cells is not dependent on N-linked glycosylation. *Cell Biol Int* 2003;27(12):997-1003.
 39. Larsen JE, Avvakumov GV, Hammond GL, Vogel LK. N-glycans are not the signal for apical sorting of corticosteroid binding globulin in MDCK cells. *FEBS Lett* 1999;451(1):19-22.
 40. Meerson NR, Bello V, Delaunay JL, Slimane TA, Delautier D, Lenoir C, Trugnan G, Maurice M. Intracellular traffic of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP3 to the apical plasma membrane of MDCK and Caco-2 cells: apical targeting occurs in the absence of N-glycosylation. *J Cell Sci* 2000;113 Pt 23:4193-4202.
 41. Alfalah M, Jacob R, Naim HY. Intestinal dipeptidyl peptidase IV is efficiently sorted to the apical membrane through the concerted action of N- and O-glycans as well as association with lipid microdomains. *J Biol Chem* 2002;277(12):10683-10690.
 42. Herrmann JM, Malkus P, Schekman R. Out of the ER--outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol* 1999;9(1):5-7.
 43. Fiedler K, Simons K. A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins. *Cell* 1994;77(5):625-626.
 44. Fullekrug J, Scheiffele P, Simons K. VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 17):2813-2821.
 45. Hara-Kuge S, Ohkura T, Ideo H, Shimada O, Atsumi S, Yamashita K. Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem* 2002;277(18):16332-16339.
 46. Cheong KH, Zacchetti D, Schneeberger EE, Simons K. VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6241-6248.
 47. Martin-Belmonte F, Puertollano R, Millan J, Alonso MA, de Marco MC, Albar JP, Kremer L. The MAL proteolipid is necessary for the overall apical delivery of membrane proteins in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney and fischer rat thyroid cell lines
The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 2000;11(6):2033-2045.
 48. Puertollano R, Martin-Belmonte F, Millan J, de Marco MC, Albar JP, Kremer L, Alonso MA. The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 1999;145(1):141-151.
 49. Delacour D, Gouyer V, Zanetta JP, Drobecq H, Leteurtre E, Grard G, Moreau-Hannedouche O, Maes E, Pons A, Andre S, Le Bivic A, Gabius HJ, Manninen A, Simons K, Huet G. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* 2005;169(3):491-501.
 50. Monlauzeur L, Breuza L, Le Bivic A. Putative O-glycosylation sites and a membrane anchor are necessary for apical delivery of the human neurotrophin receptor in Caco-2 cells. *J Biol Chem* 1998;273(46):30263-30270.
 51. Zurzolo C, van't Hof W, van Meer G, Rodriguez-Boulant E. VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *Embo J* 1994;13(1):42-53.
 52. Prinetti A, Chigorno V, Tettamanti G, Sonnino S. Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem* 2000;275(16):11658-11665.
 53. Tivodar S, Paladino S, Pillich R, Prinetti A, Chigorno V, van Meer G, Sonnino S, Zurzolo C. Analysis of detergent-resistant membranes associated with apical and basolateral GPI-anchored proteins in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* 2006;580(24):5705-5712.
 54. Keller P, Simons K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 1998;140(6):1357-1367.

Figure Legends

Figure 1

Mutants constructed to analyse the role of O- and N-glycosylation in the sorting of apical proteins in polarized epithelial cells and Western-blot of cells expressing these mutants. (A) P75^{NTR} is the wt transmembrane protein. In p75GPI the ectodomain of p75^{NTR} is fused to the GPI anchor attachment signal of PLAP. P75ΔOGPI lacks for all O-glycosylation site. (B) PLAPΔN lacks for the N-glycosylation sites. Transmembrane domain is represented by a green box, GPI anchor by a blue tail, O-glycosylated stalk by a yellow lollipop structure and N-glycosylation by a dark green branch.

All mutants were transfected in MDCK cells. Molecular weights of the proteins are indicated on the left.

Figure 2

Glycosylation is not a determinant apical targeting signal for GPI-APs. (A) Stably transfected MDCK cells expressing p75GPI and p75ΔOGPI, PLAP and PLAPΔN proteins were polarized on transwell filter, fixed, permeabilized and labelled by indirect immunofluorescence using anti-p75 ectodomain monoclonal antibodies or polyclonal anti-PLAP antibodies and TRITC-conjugated secondary antibody. Confocal sections were collected from the top to the bottom of cell monolayers. (B) Cells were incubated with sulfo-NHS-LC-biotin either on the apical or on the basolateral side, lysed, immunoprecipitated, separated by SDS-PAGE and detected by streptavidin. The histograms show percentages of apical or basolateral protein expressed as the average of three different experiments. Standard error bars are indicated.

Figure 3

GPI anchor mediates DRMs-association. (A) MDCK cells stably expressing p75GPI and p75ΔOGPI were lysed in TNEV/TX-100 buffer at 4°C and separated by centrifugation to equilibrium on 5-40% sucrose density gradients to purify TX-100 insoluble microdomains. Fractions of 1 ml were collected from top (fraction 1) to bottom (fraction 12), run on SDS-PAGE and detected by specific antibodies. An aliquot of each fraction was spotted on the nitrocellulose membrane and GM1 (a typical rafts-marker) was revealed using cholera toxin conjugated to HRP. (B) Same conditions were used for MDCK cells stably expressing PLAP and PLAPΔN proteins.

Figure 4

Glycosylation of protein ectodomain is not involved in oligomerization of apical GPI raft-associated proteins.

(A) MDCK cells stably expressing p75GPI and p75ΔOGPI were run through a nonlinear 5-30% sucrose gradient after extraction in SDS/TX-100 buffer. Fractions of 300 µl were collected from the top (fraction 1) to the bottom (fraction 15) of the gradients. Proteins were detected by Western blotting using specific antibodies. The position on the gradients of molecular weight markers is

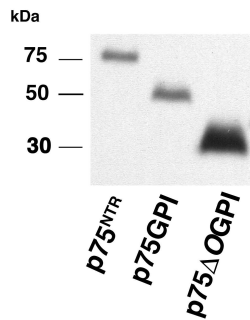
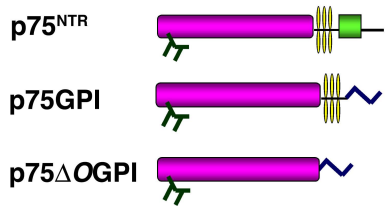
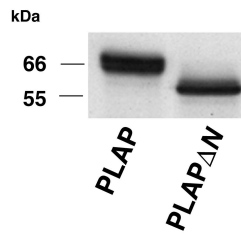
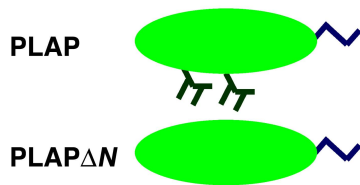
indicated on the top of the panel. Distribution curves of the average of three different experiments are shown in the right panel. (B). Same conditions were used for MDCK cells stably expressing PLAP and PLAPΔN proteins.

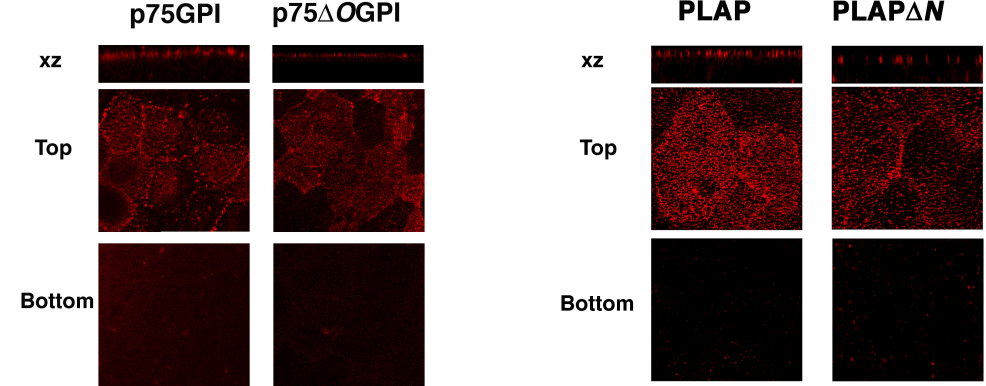
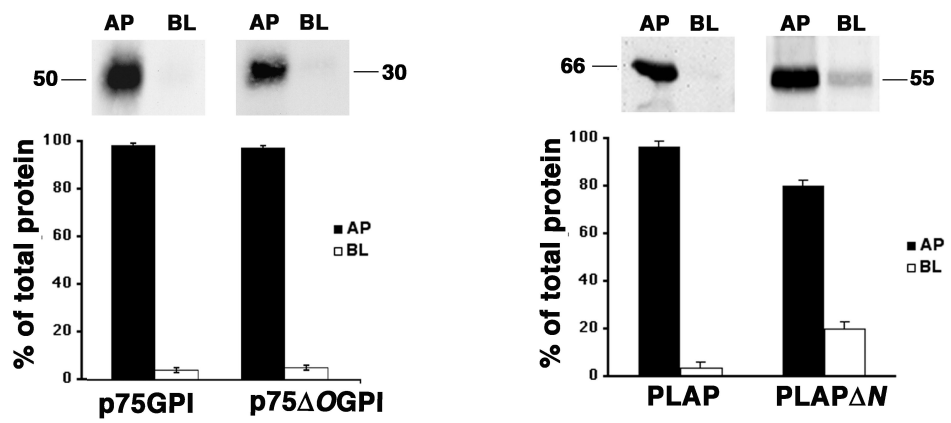
Figure 5

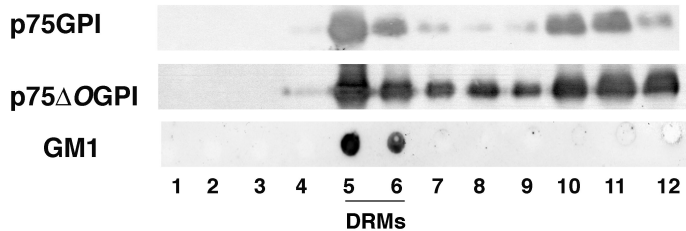
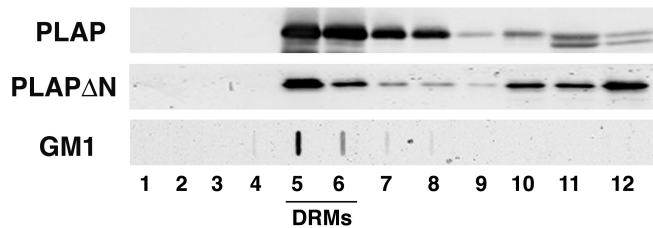
Role of N-glycosylation in the sorting of p75GPI in polarized epithelial cells. (A) In p75ΔNGPI the ectodomain of p75^{NTR} is fused to the GPI anchor attachment signal of PLAP and Asn32 is mutated in Glu. P75ΔNΔOGPI lacks also for the O-glycosylation sites. All mutants were transfected in MDCK cells. Molecular weights are indicated on the left. (B) Confocal analysis and biotinylation assay on stably transfected MDCK cells expressing p75ΔNGPI and p75ΔNΔOGPI proteins in polarized conditions. Confocal sections were collected from the top to the bottom of cell monolayers. The histogram shows percentages of apical or basolateral protein expressed as the average of three different experiments. Standard error bars are indicated. (C) DRM-association analysis of MDCK cells stably expressing p75ΔNGPI and p75ΔNΔOGPI. Fractions of 1 ml were collected from top (fraction 1) to bottom (fraction 12), run on SDS-PAGE and detected by specific antibodies. An aliquot of each fraction was spotted on the nitrocellulose membrane and GM1 (a typical rafts-marker) was revealed using cholera toxin conjugated to HRP. (D) Oligomerization state of MDCK cells stably expressing p75ΔNGPI and p75ΔNΔOGPI. Fractions of 300 µl were collected from the top (fraction 1) to the bottom (fraction 15) of the gradients. Proteins were detected by Western blotting using specific antibodies. The position on the gradients of molecular weight markers is indicated on the top of the panel. Distribution curves of the average of three different experiments are shown on the right.

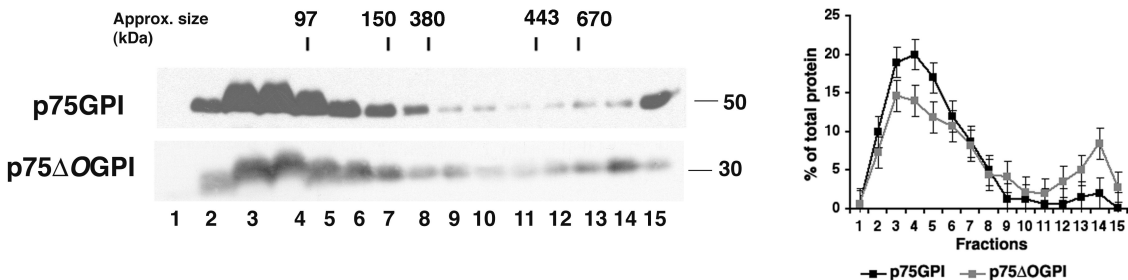
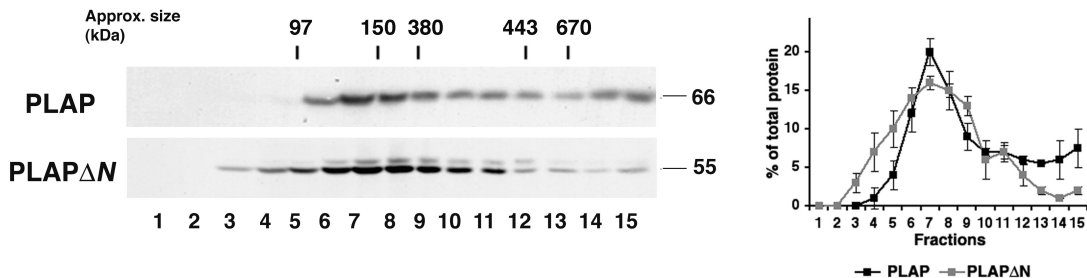
Figure 6

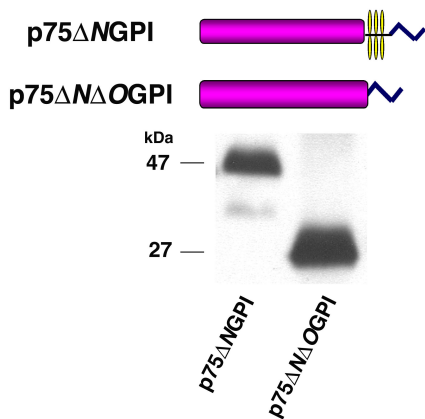
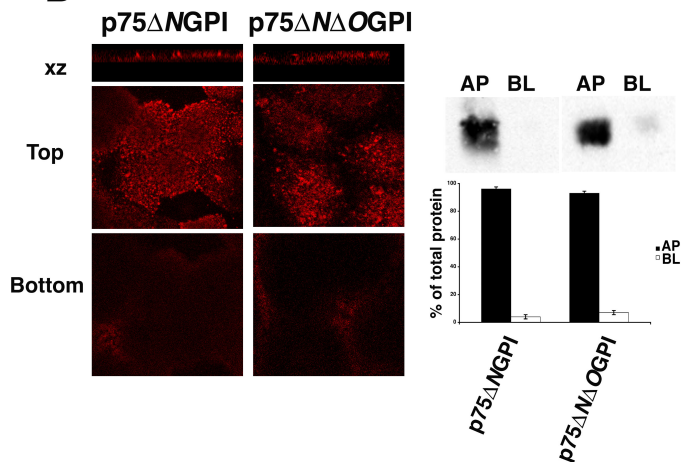
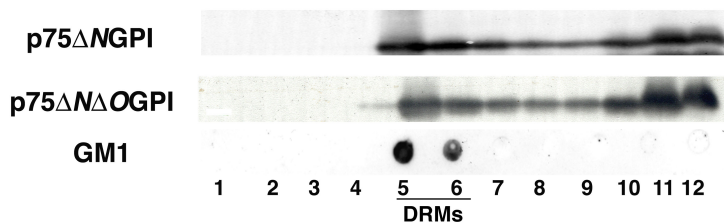
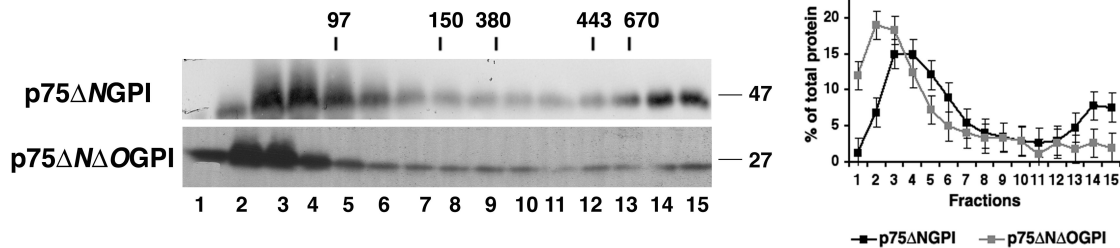
(A) MDCK cells expressing PLAP either in control conditions or after tunicamycin treatment combined or not with cholesterol depletion (see material and methods) were pulsed for 15 min with [³⁵S]-methionine and then chased for the indicated times. At the end of each chase time the cells were selectively biotinylated and lysed. Proteins were immunoprecipitated with an antibody anti-PLAP and then precipitated with streptavidin beads, run on SDS-PAGE and analysed by fluorography. (B) Alternatively after 40 min of chase cells were purified on velocity gradients. Samples were immunoprecipitated from each fraction, run on SDS-PAGE and revealed by fluorography.

A**B****Figure 1**

A**B****Figure 2**

A**B****Figure 3**

A**B****Figure 4**

A**B****C****D****Figure 5**

A



B

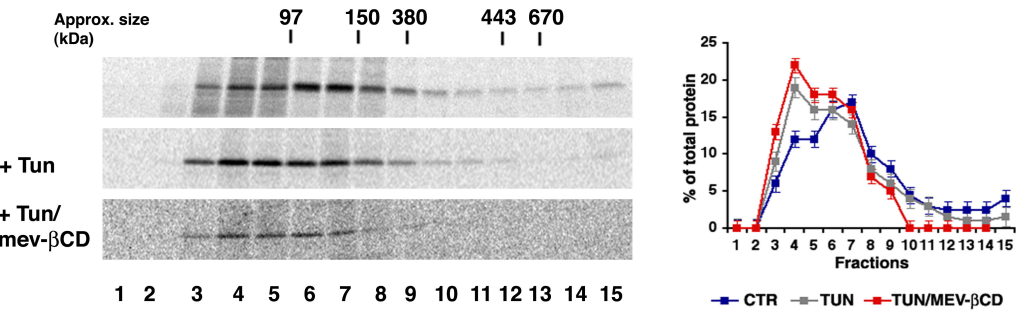


Figure 6

3- Ruolo dell'ancora GPI nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI.

I risultati di questo studio sono in fase di stesura definitiva e quindi sono descritti solo in questa sezione dei risultati.

Problematica

Nel 1998 Van Meer e Simons hanno introdotto la teoria del “lipid-rafts” secondo cui proteine ad ancora GPI sono smistate alla superficie apicale di cellule epiteliali polarizzate grazie alla loro affinità per specifici microdomini lipidici detti “rafts” (van Meer and Simons, 1988). In particolare l'impacchettamento delle proteine GPI ancorate nella “fase liquido-ordinata” costituita dai rafts è facilitato dalle lunghe catene sature aciliche ed alchiliche della porzione lipidica dell'ancora (Schroeder *et al.*, 1998). Noi abbiamo ipotizzato che l'oligomerizzazione delle proteine GPI apicali, dipendente da interazioni specifiche proteina-proteina, sia responsabile della conversione di piccoli rafts lipidici in un rafts di dimensioni maggiori che costituirebbero la piattaforma da cui parte lo smistamento di vescicole apicali (Paladino *et al.*, 2004).

Da cosa dipenda l'oligomerizzazione delle proteine GPI apicali non è chiaro. Una possibilità è che l'ancora GPI, oltre a garantire l'inserzione delle proteine a cui è legata nei microdomini lipidici, possa promuoverne anche l'aggregazione in complessi ad alto peso molecolare. Specifiche eterogeneità strutturali dell'ancora potrebbero guidare esclusivamente l'interazione di proteine GPI apicali e non di quelle basolaterali determinando la loro corretta localizzazione. Dati ottenuti nel nostro laboratorio supportano l'ipotesi di un ruolo centrale

dell'ancora GPI nel guidare la corretta localizzazione di superficie e la capacità di oligomerizzare delle proteine apicali GPI. Due proteine con lo stesso ectodominio, GFP (Green Fluorescent Protein), ma differente segnale di attacco per l'ancora GPI sono state trasfettate stabilmente in cellule MDCK. In particolare sono state analizzate GFP-FR, il cui segnale di attacco deriva da una proteina GPI apicale (recettore del folato, FR) che è capace di formare complessi ad alto peso molecolare e GFP-PrP in cui il segnale deriva da una proteina GPI basolaterale (la proteina prionica cellulare, PrP^c), presente esclusivamente in forma monomerica. Abbiamo trovato che entrambe le proteine sono associate a rafts ma solo GFP-FR forma complessi ad alto peso molecolare ed è smistata all'apice mentre GFP-PrP è basolaterale. Questi risultati indicano un coinvolgimento dell'ancora nello smistamento alla superficie e nella formazione di oligomeri.

In questa parte della tesi di dottorato ho analizzato la struttura molecolare dell'ancora GPI purificata da una proteina smistata alla superficie apicale e dell'ancora purificata da una proteina basolaterale in cellule epiteliali polarizzate. In particolare ho usato due proteine native ad ancora GPI: l'apicale PLAP (placental alkaline phosphatase) e la basolaterale PrP^c trasfettate in cellule MDCK e FRT (Fig. 11). In entrambe le linee cellulari le due proteine sono DRM-associate e, corrispondentemente al modello proposto da Paladino et al. (Paladino *et al.*, 2004), PLAP forma complessi ad alto peso molecolare, mentre PrP no (Fig. 12). Differenze nella struttura delle due ancore spiegherebbero il diverso comportamento delle due proteine all'uscita del TGN. Poichè questa eterogeneità di struttura è cellula-specifica, le analisi sono state condotte su due tipi cellulari differenti (FRT e MDCK).

Le informazioni presenti in letteratura sulla struttura delle ancore di PLAP e PrP sono poche ed estremamente frammentarie (Stahl *et al.*, 1987; Stahl *et al.*, 1992; Redman *et al.*, 1994;

Benting *et al.*, 1999a). Inoltre finora questo tipo di analisi sono state effettuate combinando una varietà di tecniche lunghe e poco sensibili. In questo lavoro, quindi, ho ottimizzato una metodica lineare ed altamente sensibile basata sull'analisi per spettrometria di massa per poter ottenere una struttura completa ed affidabile delle ancore di GPI di proteine di membrana, proteine presenti nella cellula in basso numero di copie.

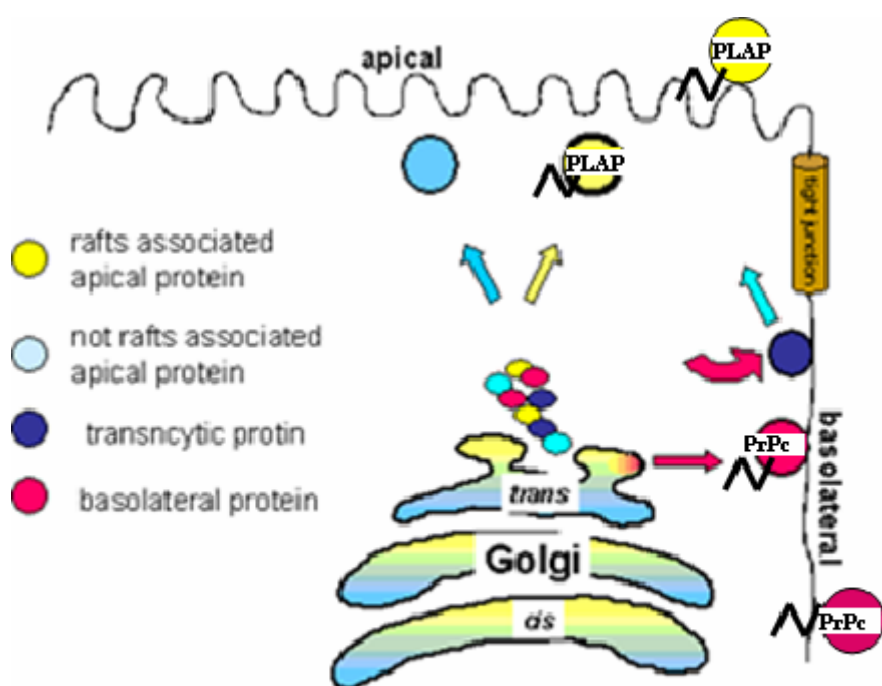


Fig. 11 Smistamento polarizzato di PLAP e PrP^c, due proteine native ad ancora GPI in cellule epiteliali polarizzate.

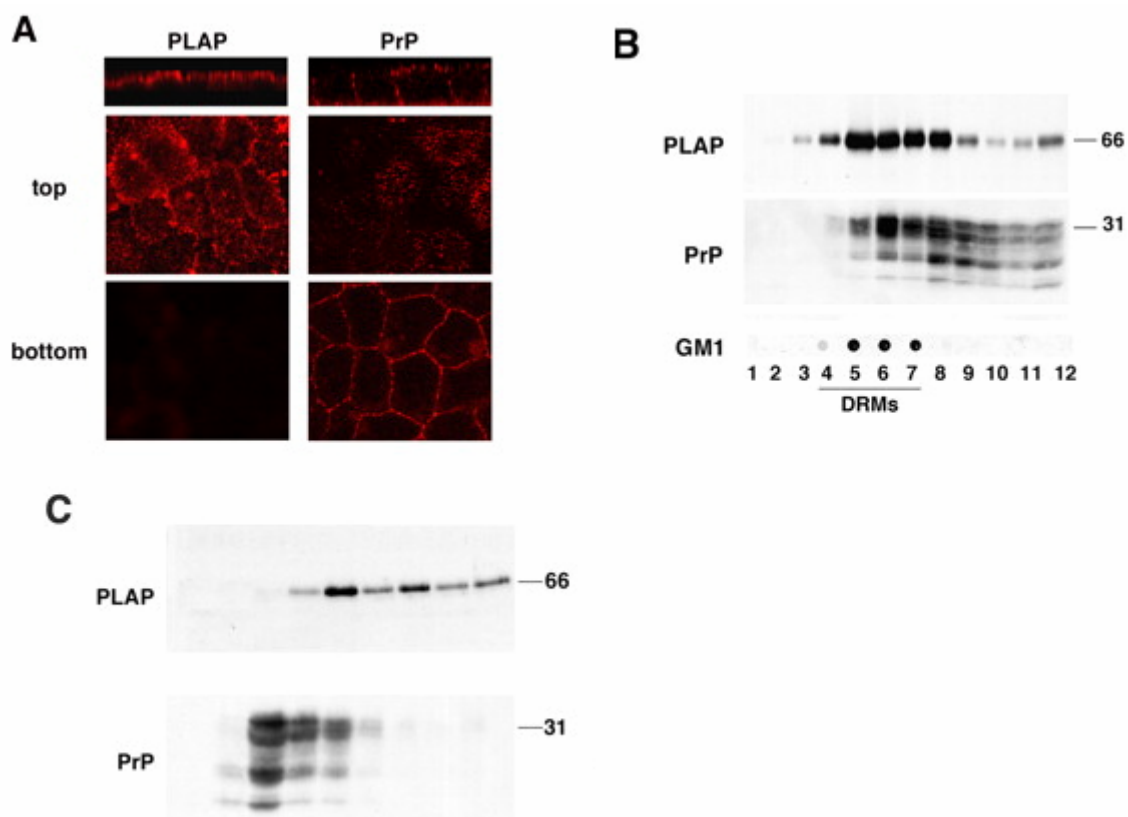


Fig. 12 Localizzazione di superficie, associazione a DRMs e oligomerizzazione di PLAP e PrP^c in cellule MDCK.

Da analisi di microscopia confocale (**A**), PLAP risulta essere apicale in cellule MDCK, mentre PrP^c basolaterale. Entrambe le proteine associano a DRMs (**B**), ma solo PLAP è capace di oligomerizzare (**C**). Risultati simili sono ottenuti per le stesse proteine stabilmente trasfettate in cellule FRT. (*Adattata da Paladino et al., JCB, 2004*).

Materiali e Metodi: Analisi della struttura dell'ancora GPI:

1) preparazione del campione.

Uno dei principali problemi che ho dovuto affrontare è stato quello di ottenere una quantità sufficiente di materiale (ancora GPI purificata) per le successive analisi di spettrometria di massa. Per determinare la struttura delle ancore GPI delle proteine di interesse, ho messo a punto, quindi, una metodologia “off-blot” altamente sensibile, che prevede l'estrazione delle ancore dopo il loro trasferimento su membrana di PVDF (polyvinylidene fluoride) (Fig. 13). PLAP e PrP sono state purificate partendo da una grande quantità di cellule FRT e MDCK (circa 200 milioni) mediante immunoprecipitazione con anticorpi diretti contro la porzione proteica delle proteine in questione legati alla proteina A. L'anticorpo è stato legato in maniera covalente alle sfere di proteina A in modo tale da eliminare dagli eluati dell'immunoprecipitazione le catene leggere e pesanti delle immunoglobuline che potrebbero sovrapporsi alle bande corrispondenti alle proteine di interesse. La proteina A legata all'anticorpo che avrà a sua volta sequestrato la proteina contro cui è diretto, è stata sottoposta a diversi lavaggi in tamponi a forza ionica decrescente ed infine le proteine di interesse sono state eluite in acido propionico 1.0 M. Quest'acido debole permette di concentrare gli eluati di tutte le immunoprecipitazioni che sono necessarie per purificare la quantità necessaria per la nostra analisi. Gli eluati a questo punto sono stati separati su gel di acrilammide (SDS-PAGE) e successivamente trasferiti mediante western-blot su membrana di PVDF. La banda corrispondente alla proteina di interesse è stata individuata mediante colorazione al rosso ponceau e confronto con una membrana preparata in duplice copia incubata con specifici anticorpi e rivelata con ECL (enhanced Chemiluminescence).

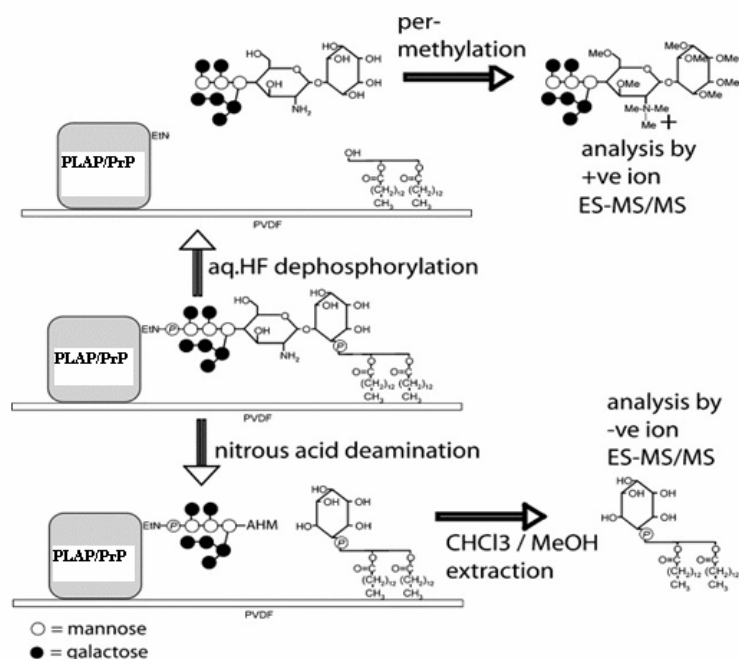


Fig. 13 Schema di reazione dell'analisi delle ancore di GPI di PLAP e PrP.

Le proteine purificate da cellule MDCK e FRT sono state immobilizzate su PVDF mediante Western blotting. La membrana può essere trattata con HF acquoso per rilasciare la porzione glicidica idrofila della GPI per la successiva permetilazione e analisi con spettrometria di massa ES/MS-MS in modalità positiva o con acido nitroso che separa la proteina dalla componente PI dell'ancora GPI. La porzione lipidica del PI è poi recuperata mediante estrazione con solventi ed analizzata con spettrometria di massa ES/MS-MS in modalità negativa. (Adattata da Mehlert and Ferguson, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2007).

2) analisi degli zuccheri dell'ancora GPI.

Le bande corrispondenti a PLAP e PrP, individuate in seguito a colorazione con rosso ponceau e riconoscimento mediante anticorpi specifici, sono state ritagliate dalla membrana di PVDF e poste in tubi Eppendorf. Dopo attivazione con metanolo, le strisce di PVDF contenenti la proteina di interesse sono state trattate con acido fluoridrico acquoso (HF aq.)

per 60 ore (50% w/v) a 0°C. Questo acido estremamente forte permette di tagliare tutti i legami fosfato, liberando la porzione idrofila dell'ancora che passa in soluzione, mentre l'ectodominio della proteina e la porzione lipidica dell'ancora rimangono sulla membrana di PVDF (Fig. 14). L'HF aq. è quindi rimosso e le strisce sono state lavate due volte con acqua. Quest'acqua di lavaggio, unita all'HF aq., è stata liofilizzata. I glicani dell'ancora GPI risultanti, rilasciati dalla defosforilazione con HF aq., sono stati dissolti in acqua, lavati con metanolo per assicurarsi la completa rimozione dell'acqua, ridissolti in DMSO e permetilati (vedi materiali e metodi). In seguito ad aggiunta di cloroformio/acqua (1:1) i glicani permetilati si ripartiscono nella fase più bassa del cloroformio. Questa frazione è stata lavata varie volte con acqua, seccata all'azoto, dissolta in 80% acetonitrile, 0.1 M acetato di sodio e analizzata mediante spettrometria di massa con ionizzazione a elettrospray in modalità positiva (ES-MS) e spettrometria di massa tandem elettrospray (ES-MS/MS) utilizzando lo spettrometro di massa ABI Q-STARXL (Fig. 14). La permetilazione di tutti i gruppi idrossilici degli oligosaccaridi, insieme alla formazione del catione ammonio quaternario (per es. il residuo di glucosammina tri-*N*-metilato in Fig. 13), facilita la ionizzazione e quindi la caratterizzazione spettrometrica dei glicani dell'ancora GPI defosforilati.

3) analisi del fosfatidilinositolo dell'ancora GPI.

Le strisce corrispondenti alle bande di PLAP e PrP sono state ritagliate, insieme ad una striscia controllo priva di proteine. Le bande sono state lavate in metanolo tre volte, poi in cloroformio/metanolo 1:1 v/v tre volte e metanolo tre volte. La deamminazione con acido nitroso dei campioni è stata effettuata ponendo la striscia di PVDF in un eccesso di un ugual volume di 300 mM di acetato di sodio pH 4.0 e di NaNO₂ 1 M preparato al momento a 37°C per 3 ore. Le strisce sono state lavate con acqua tre volte e lasciate seccare all'aria. Il

fosfatidilinositolo (PI) rilasciato dalla deamminazione è stato estratto dal blot con cloroformio/metanolo (1:1 v/v) e questa soluzione è stata caricata in speciali punte di vetro ricoperte d'oro per nanospray per l'analisi ES/MS-MS con sistema ABI Q-STARXL. (Per la descrizione dello strumento e del principio di utilizzo vedi la sezione materiali e metodi della tesi.)

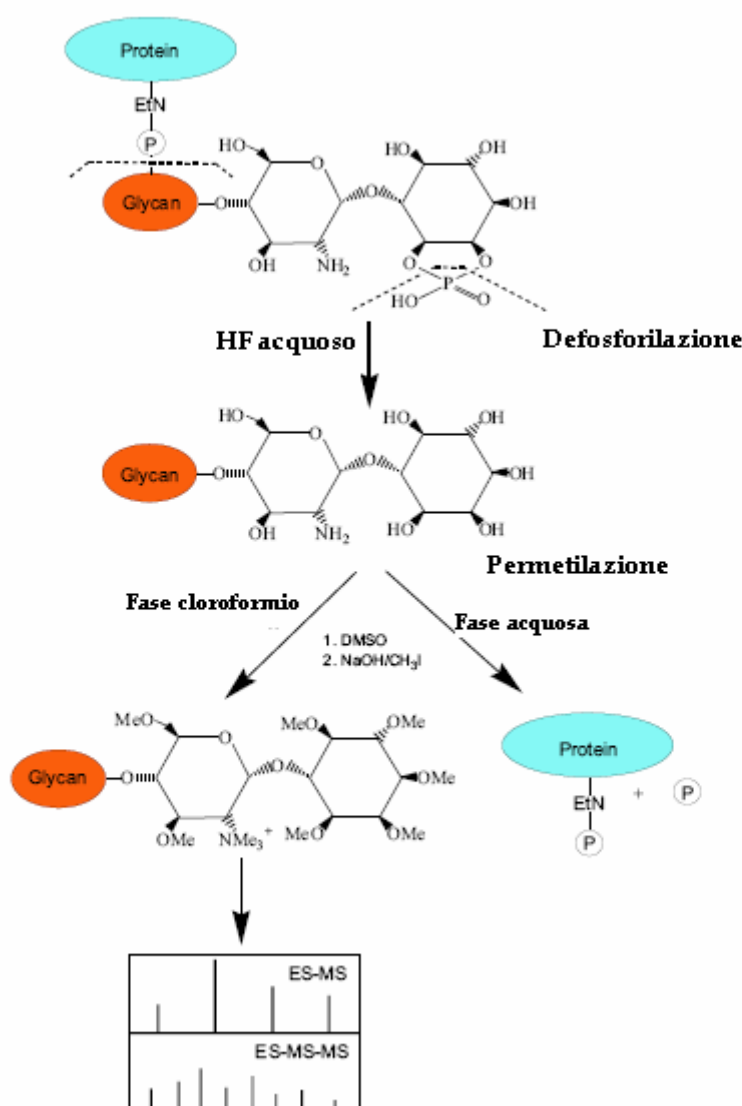


Fig. 14. Schema per determinare la struttura della porzione idrofila dell'ancora GPI.

La frazione glicidica rilasciata dalla defosforilazione con HF acquoso è stata permetilata, recuperata mediante estrazione con solventi e analizzata mediante ES-MS e ES-MS/MS.

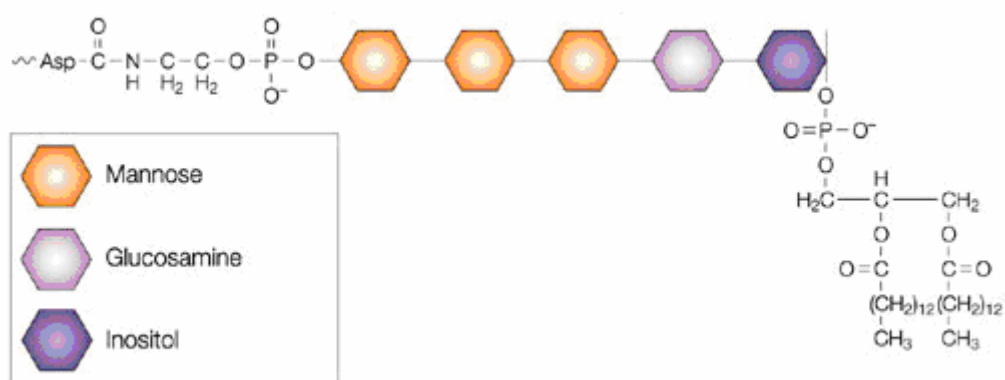
Risultati :

1) struttura dei glicani delle ancore GPI di PLAP e PrP purificate da cellule FRT e MDCK.

Lo spettro elettrospray dei glicani dell'ancora GPI è stato registrato nell'intervallo m/z inferiore a 2500. Il limite superiore di massa è stato scelto in modo tale da poter osservare ioni pseudomolecolari a singola carica derivanti da sei residui di galattosio, il numero massimo noto in natura. Il catione addotto al sodio rappresenta in questi spettri il più alto e abbondante stato di carica +2, mentre ioni pseudomolecolari a tripla o maggiore carica non sono stati trovati. Per aumentare le informazioni strutturali ottenibili dalla spettrometria di massa, in particolare per definire la sequenza e la ramificazione degli zuccheri delle ancore GPI, sono state effettuate analisi di dissociazione indotta da collisione (CID) sui glicani delle ancore GPI permetilati e con doppia carica. Infatti i glicani vengono ionizzati in maniera più efficiente come addotti del sodio, risultando in ioni di carica +2 presenti in relativamente alta abbondanza. Lo spettro di collisione dei glicani permetilati è stato registrato su un valore m/z almeno due volte maggiore rispetto allo ione precursore doppiamente carico. L'analisi della frazione glicidica mediante ES-MS, unita alla frammentazione degli ioni $[M + Na]^{2+}$ mediante analisi ES-MS/MS, ci ha permesso di ottenere l'esatta composizione in zuccheri delle ancore di PLAP e PrP estratte da cellule FRT e MDCK. I risultati sono riassunti nella tabella 3, mentre in figura 15 sono riportati due esempi di spettri di collisione. La composizione glicidica delle due ancore nei due diversi tipi cellulari non sembra presentare differenze significative. In cellule MDCK la specie predominante è quella con tre esosi legati alla glucosammina dell'inositolo (m/z 667,87), mentre in cellule FRT predomina la specie a

quattro esosi legati alla glucosammina dell'inositolo (m/z 565,81) (vedi tab. 3).

			MDCK		FRT	
m/z [M+Na] ²⁺	MASS	COMPOSITION	PLAP	PrP	PLAP	PrP
565,81	1108,61	Hex3HexN1Ino1	+++	+++	+	+
667,86	1312,71	Hex4HexN1Ino1	-	+	+++	+++
688,36	1353,73	HexNAc1Hex3HexN1Ino1	-	-	-	-
790,42	1557,84	HexNAc1Hex4HexN1Ino1	-	-	++	-
892,46	1761,93	HexNAc1Hex5HexN1Ino1	-	-	-	-



Tab. 3 Ancore GPI di PLAP e PrP^c da cellule FRT e MDCK hanno la stessa composizione glicidica. Rappresentazione schematica di un ancora GPI.

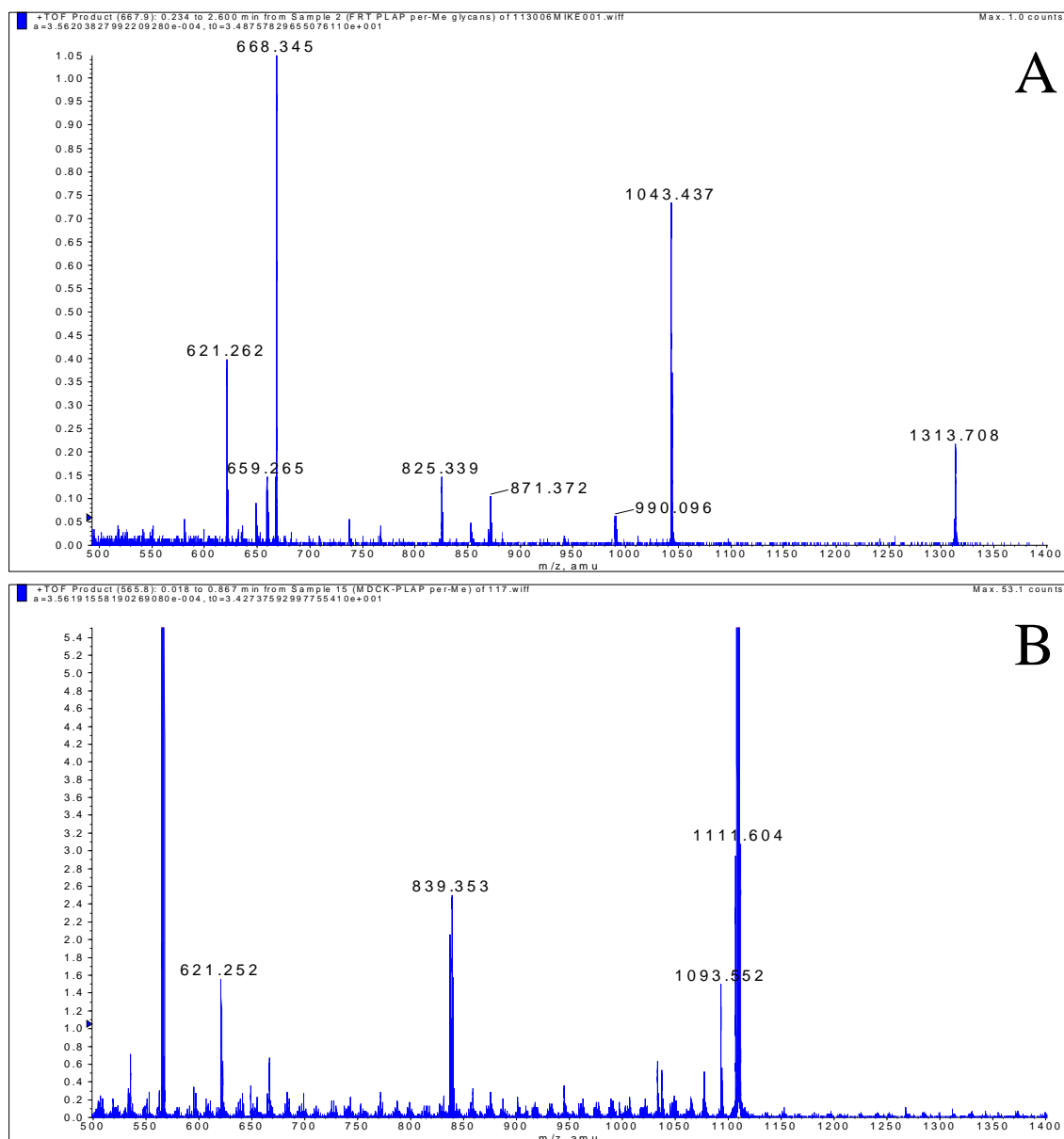
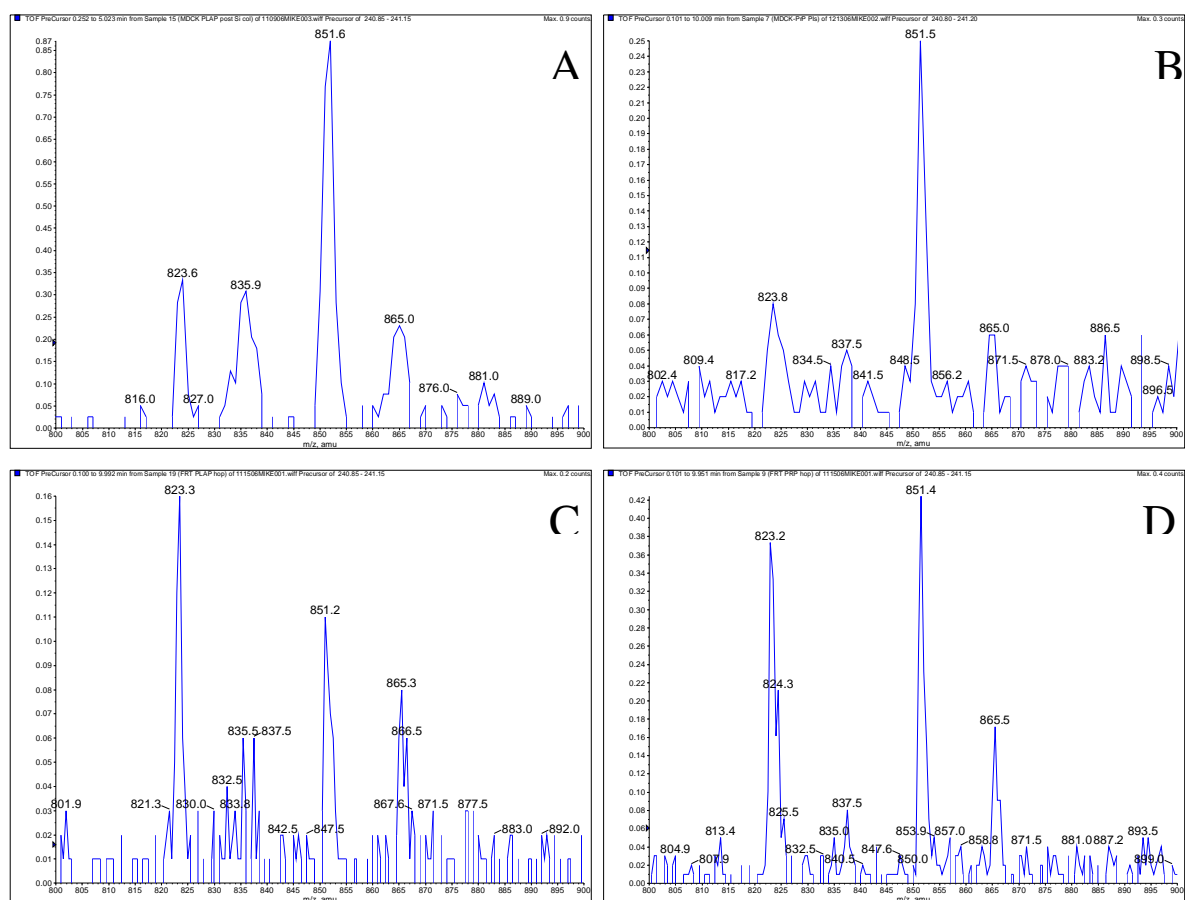


Fig. 15. ES-MS/MS in modalità positiva di glicani GPI permetilati di PLAP da cellule FRT.

A. Spettro ES-MS/MS dello ione precursore a m/z 667.9. Lo ione a m/z 1043.5 è dovuto alla perdita di un residuo esoso dall'estremità riducente. **B.** Spettro ES-MS/MS dello ione precursore a m/z 565.8. Lo ione a m/z 839.35 è dovuto alla perdita di un residuo esoso dall'estremità riducente.

2) struttura dei lipidi delle ancore GPI di PLAP e PrP purificate da cellule FRT e MDCK.

Analisi ES-MS e ES-MS/MS condotte in modalità negativa, mi hanno permesso di identificare e caratterizzare la porzione del fosfatidilinositolo delle ancore di PLAP e PrP purificate da cellule FRT e cellule MDCK (Fig. 16).



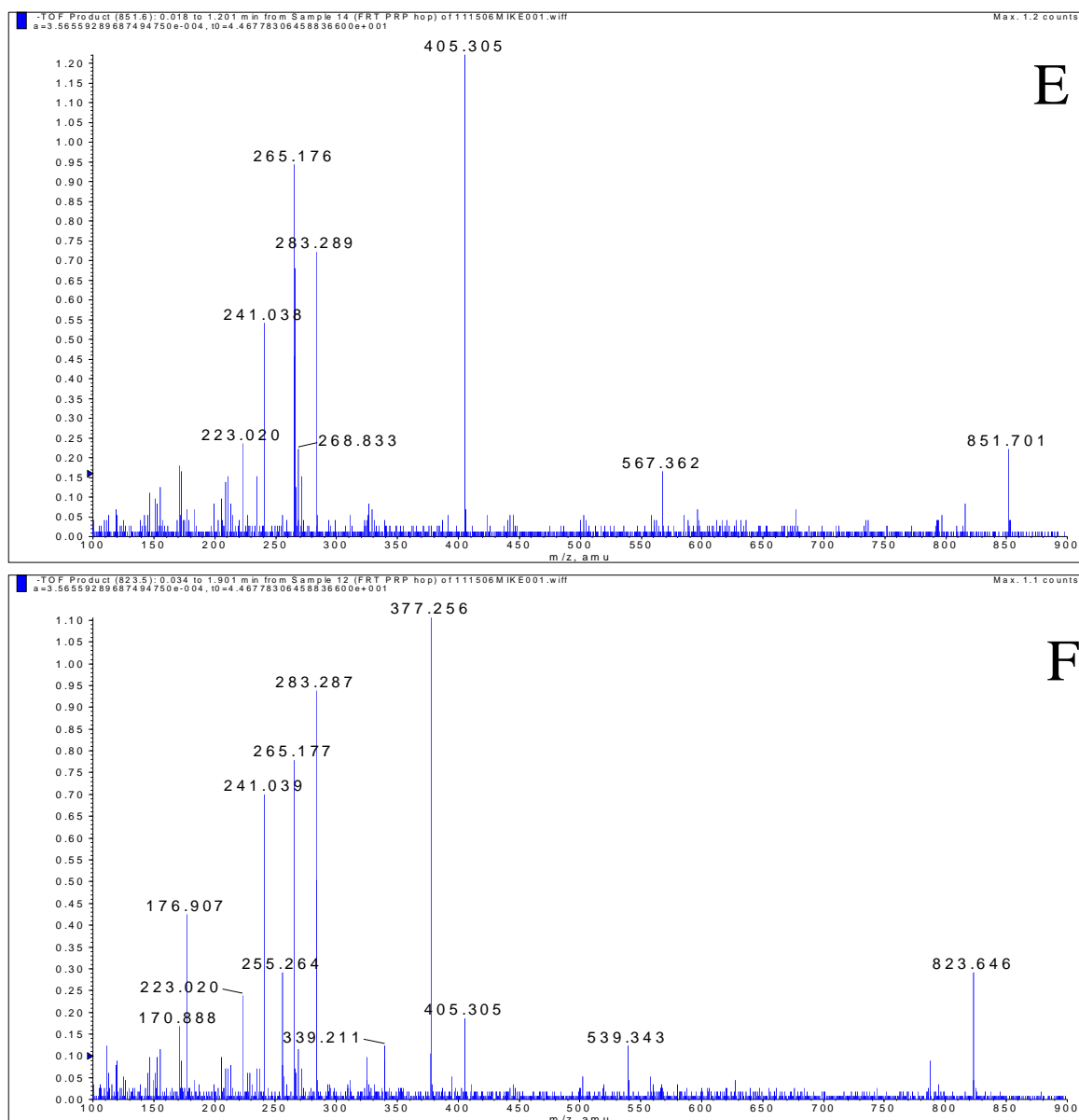


Fig. 16 Spettrometria di massa elettrospray in modalità negativa della porzione PI di PLAP e PrP rilasciata dal trattamento con acido nitroso.

A-D. Spettri ES-MS di PLAP e PrP nelle due linee cellulari. Vedi testo per dettagli. **E.** Spettro ES-MS/MS dello ione precursore a m/z 851 di PrP da cellule FRT. **F.** Spettro ES-MS/MS dello ione precursore a m/z 823 di PrP da cellule FRT.

Dagli spettri di massa risultanti da questo esperimento abbiamo ottenuto informazioni circa il numero totale di atomi di carbonio e il grado di insaturazione degli acidi grassi legati al PI

liberato dalla deaminazione con acido nitroso (Fig. 16). In particolare gli ioni a rapporto m/z 823, 837, 851 e 865 corrispondono rispettivamente a C16:0, C18:0 alchilalchil-PI; C18:0, C16:0 diacil-PI; C18:0, C18:0 alchilalchil-PI e C18:0, C18:0 diacil-PI. Questi dati sono stati confermati dalla spettrometria ES-MS/MS, in cui è possibile riconoscere prodotti di frammentazione quali ad es. l'inositolo fosfato ciclico a m/z 241.0, il C18:0 a m/z 283.2, l'inositolo fosfato ciclico con il C16:0 legato a m/z 377.2 o con il C18:0 legato a m/z 405.3.

Da questa analisi emerge che l'ancora GPI di PLAP e PrP^c da cellule MDCK e FRT hanno la stessa composizione lipidica. Tutte le ancore sono formate dalla stessa miscela di quattro differenti coppie di lunghe e saturate catene di acidi grassi (vedi tab. 4).

MDCK PLAP	FRT PLAP	MDCK PrP^c	FRT PrP^c
C16:0 alkyl	C16:0 alkyl	C16:0 alkyl	C16:0 alkyl
C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl
C16:0 acyl	C16:0 acyl	C16:0 acyl	C16:0 acyl
C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl
C18:0 alkyl	C18:0 alkyl	C18:0 alkyl	C18:0 alkyl
C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl
C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl
C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl	C18:0 acyl

Tab. 4 Composizione lipidica delle ancore di PLAP e PrP^c da cellule FRT e MDCK.

Tutte le ancore sono caratterizzate dalla stessa miscela di coppie di acidi grassi.

Conclusioni.

Questo lavoro ha permesso la prima determinazione completa dell'ancora GPI di PLAP e PrP^c

purificate da due linee di cellule epiteliali polarizzate: cellule FRT e MDCK. Finora si avevano solo frammentarie e scarse informazioni sulla struttura di queste due ancore GPI.

La grande difficoltà di quest'analisi è consistita nello sviluppare una metodica abbastanza sensibile da permettere di analizzare proteine come quelle di membrana presenti in basso numero di copie nella cellula. La metodologia dell' "off-blot" era già stata utilizzata in letteratura per analizzare la componente PI delle ancore (Thomson *et al.*, 2002), ma non era mai stata combinata alla funzione ione precursore dello spettrometro di massa QSTAR XL. Anche l'uso della permetilazione per determinare i glicani dell'ancora è già stata descritta (Baldwin, 2005), ma non è mai stata accoppiata alla metodologia dell' "off blot". La combinazione del potere risolutivo della SDS-PAGE, della permetilazione e della formazione del catione ammonio quaternario, l'uso dello QSTAR XL hanno permesso di sviluppare una tecnica altamente sensibile che permette l'analisi strutturale anche di molecole presenti in basse quantità.

Da quest'analisi non sono state riscontrate differenze nella struttura dell'ancora di proteine apicali e basolaterali. Le ancore di PLAP e PrP^c hanno lo stessa composizione sia della parte glicidica che della parte lipidica. Non ci sono differenze significative neanche tra le cellule FRT e le cellule MDCK. La composizione del core glicidico dell'ancora riflette quella più comune a tutte le ancore finora analizzate derivate da cellule di mammifero (Fig. 8), mentre le lunghe e sature catene aciliche e alchiliche riflettono la capacità di entrambe le proteine ad associarsi a rafts lipidici. Quindi questi risultati allo stato attuale non permettono di attribuire a differenze strutturali delle ancore la responsabilità del comportamento delle proteine smistate all'apice o alla base. Però bisogna considerare che sebbene gli spettri ES-MS e ES-MS/MS siano ricchi di informazioni sulla struttura glicidica dell'ancora, essi non danno

informazioni circa residui fosfato attaccati ai glicani in quanto questi sono stati tagliati dalla digestione con HF aq. Nel lievito la fosfoetanolamina presente sul Man2 è importante per il corretto smistamento di proteine ad ancora GPI nelle cellule figlie dopo la citochinesi (Shishioh *et al.*, 2005). Ciò indicherebbe un possibile ruolo di questo sostituito fosfato nel trasporto intracellulare di proteine GPI in cellule di mammifero. Prima di escludere definitivamente che una differenza strutturale dell'ancora GPI possa essere responsabile di un differente smistamento delle proteine alla membrana plasmatica, è necessario quindi analizzare anche eventuali fosfoetanolamine presenti sui glicani delle ancore.

4- Identificazione di putativi recettori responsabili dell'oligomerizzazione e dello smistamento apicale di proteine ad ancora GPI.

I risultati di questo lavoro sono ancora preliminari e quindi descritti solo di seguito.

Problematica

L'oligomerizzazione di proteine GPI ancorate che avviene concomitantemente alla loro associazione a rafts lipidici, è un requisito essenziale per il loro smistamento apicale (Paladino *et al.*, 2004). L'assemblamento delle proteine GPI in complessi ad alto peso molecolare gioca un ruolo centrale nella fase di segregazione dalle proteine basolaterali. Rafts lipidici rappresentano un ambiente favorevole per l'oligomerizzazione delle proteine ad ancora GPI. Un'ipotesi è che putativi recettori presenti nei rafts possano riconoscere segnali di smistamento apicali sulle proteine, favorire la loro oligomerizzazione e contribuire a indirizzarle al corretto polo cellulare. Questa ipotesi è ancora più verosimile in seguito ai risultati che ho ottenuto analizzando il ruolo dell'ectodominio proteico e dell'ancora di proteine GPI nell'oligomerizzazione e nello smistamento di proteine apicali. I dati che ho ottenuto finora escludono un coinvolgimento della struttura dell'ancora nel diverso comportamento delle proteine apicali e basolaterali e dalle analisi condotte su proteine glicosilate emerge che un recettore *N*-glicosilato possa essere responsabile dello smistamento e del "clustering" di due proteine modello native glicosilate e GPI ancorate (vedi risultati paragrafo 2 e 3).

Questa ipotesi era già stata presa in considerazione in letteratura dove si trovano esempi di potenziali recettori implicati nello smistamento apicale. La proteina integrale vescicolare

(VIP36), appartenente alla famiglia delle lectine, è stata la prima ad essere implicata nello smistamento apicale (Fiedler and Simons, 1996). Tuttavia il suo ruolo come recettore apicale è stato messo in discussione da studi che dimostrano il coinvolgimento di questa proteina nel traffico dall'ER al Golgi (Fullekrug *et al.*, 1999; Hara-Kuge *et al.*, 2002). La proteina VIP17/MAL è coinvolta nello smistamento apicale di HA e di altre proteine GPI (Cheong *et al.*, 1999; Puertollano *et al.*, 1999). Inoltre recentemente è stato dimostrato che l'interazione tra la galectina-4 e i sulfatidi è importante nell'organizzazione dei rafts lipidici per un efficiente traffico apicale in cellule HT-29 (Delacour *et al.*, 2005).

Tuttavia sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo di questi recettori nel mantenimento della polarità cellulare e per una loro identificazione certa.

A questo scopo durante il mio dottorato ho sviluppato una metodica per ottenere la proteomica dei complessi ad alto peso molecolare formati da proteine GPI ancorate apicali in cellule epiteliali. In particolare ho scelto la proteina PLAP, proteina nativa GPI ancorata, peraltro già utilizzata nei miei lavori sul ruolo della glicosilazione dell'ectodominio e dell'ancora. PLAP è stata stabilmente espressa in cellule FRT, cellule per cui l'analisi proteomica dei complessi ad alto peso molecolare formati da PLAP è facilitata in quanto l'intera sequenza genomica é disponibile in banche dati pubbliche.

Risultati preliminari.

Allo scopo di identificare un eventuale recettore proteico in grado di mediare l'oligomerizzazione di proteine apicali ad ancora GPI e quindi il loro corretto smistamento sulla superficie cellulare, ho deciso di effettuare la proteomica degli oligomeri formati dalla proteina apicale e GPI ancorata PLAP prodotta da cellule FRT. Con questa tecnica è infatti

possibile identificare tutte le proteine presenti nell'oligomero e quindi individuare eventuali interattori proteici.

Per ottenere quantità sufficienti per l'analisi mediante metodiche di spettrometria di massa, ho sviluppato un doppio metodo di purificazione: centrifugazione all'equilibrio su gradiente di saccarosio, seguita da immunoprecipitazione con anticorpi diretti contro la porzione proteica della proteina apicale che forma gli oligomeri. PLAP si associa a DRMs, quindi è concentrata principalmente nelle frazioni 4-5 e 6 dei gradienti di saccarosio. Questo passaggio permette una prima purificazione del lisato cellulare in quanto tutti i contaminanti e le proteine non associate a rafts sono escluse dall'analisi. Le frazioni contenenti proteine raft-associate sono state individuate mediante il marcatore dei rafts GM1. L'effettiva presenza della proteina di interesse in queste frazioni è stata verificata mediante incubazione con l'anticorpo anti-PLAP per western-blot. Queste frazioni del gradiente sono state unite e sono state sottoposte ad immunoprecipitazione. Con questa tecnica l'anticorpo diretto contro la proteina specifica permette di purificare PLAP, sia sottoforma monomerica sia associata in complessi ad alti pesi molecolari, e le proteine che compongono questi oligomeri. L'eluato dell'immunoprecipitazione è quindi sottoposto a TCA precipitazione per eliminare i contaminanti (come detergenti e sali) e a digestione enzimatica con tripsina. I peptidi risultanti sono stati separati e caratterizzati mediante nanocromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa ES-MS e ES-MS/MS. Anche in questo caso è stato utilizzato lo spettrometro QSTAR XL (vedi materiali e metodi) (Fig. 17).

I dati di frammentazione sono stati analizzati con il programma MASCOT Daemon utilizzando SWISS PROT come banca dati.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in parallelo anche sulla proteina basolaterale PrP^c

estratta da cellule FRT (e immunoprecipitata con un anticorpo anti-PrP) e su un lisato semplice di cellule FRT (immunoprecipitato con anticorpi diretti contro PLAP). In questo modo è possibile effettuare un'analisi per sottrazione eliminando tutte le proteine legate indifferentemente a proteine GPI ancorate apicali e basolaterali e tutte le proteine che vengono riconosciute in maniera aspecifica dall'anticorpo anti-PLAP.

Finora queste analisi, ancora preliminari, mi hanno permesso di identificare una serie di proteine presenti esclusivamente negli oligomeri formati dalla proteina apicale PLAP. Questi dati sono schematizzati in tabella 5.

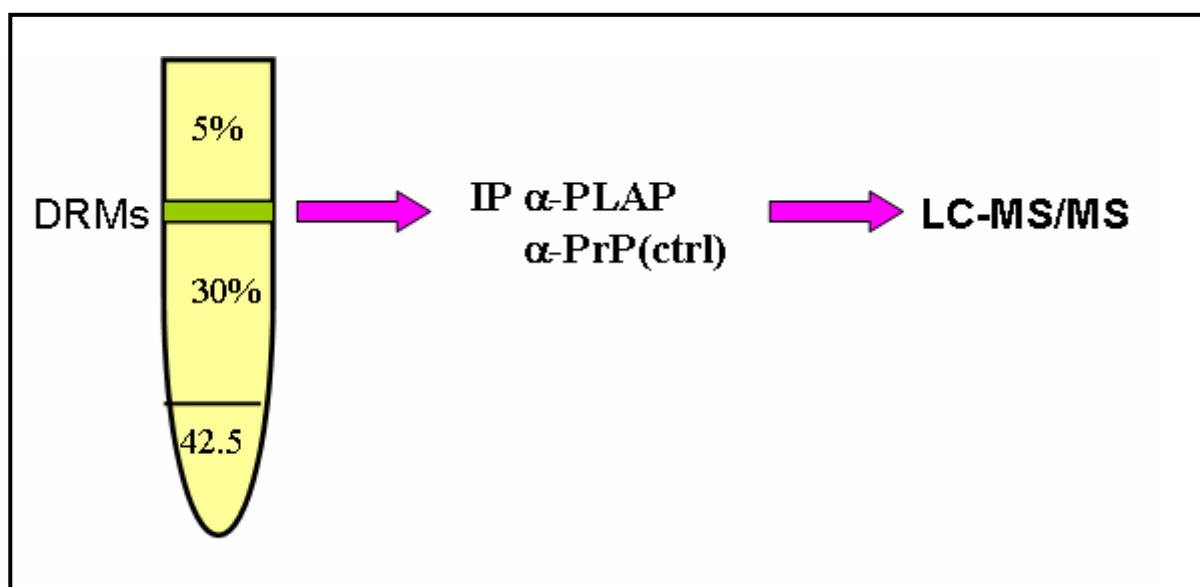


Fig. 17. Metodica di purificazione degli oligomeri.

Accession Number	Protein Name	MW (kDa)
CHP1_RAT (P61023)	Calcium-binding protein	22,5
CX6B1_MOUSE (P56391)	Cytochrome c oxidase subunit VIb	10
DAG1-MOUSE (Q62165)	Dystroglycan precursor	97
PLAK_RAT (Q6POK8)	Junction plakoglobin	82
LIN7C_RAT (Q792I0)	Lin-7 homolog C (Lin-7C)	22
THOC4_MOUSE (O08583)	THO complex subunit 4	27
gi/62655196	Similar to Arp2/3 complex subunit 2	40
MYO1B_RAT (Q05096)	Myosin 1b	132
RAP1B_RAT (Q62636)	Ras-related protein Rap-1b	21
MYL6_RAT (Q64119)	Myosin light polypeptide 6	17

Tab. 5 Proteine identificate dopo immunoprecipitazione degli oligomeri formati da PLAP in cellule FRT

Tutte le proteine sono state identificate utilizzando la banca dati SWISS PROT, eccetto la “similar to Arp2/3 complex” che è stata identificata utilizzando NCBI. Questi dati risultano dalla combinazione di più esperimenti.

Conclusioni.

Studi precedenti hanno ipotizzato che un putativo interattore proteico possa avere un ruolo centrale nel mediare l'oligomerizzazione di proteine ad ancora GPI. Diversi studi hanno portato all'identificazione di alcune proteine appartenenti alla famiglia delle lectine, in particolar modo della galectina-4 che sembra avere un ruolo nello smistamento apicale di proteine. Analisi condotte durante la mia tesi di dottorato sembrano avallare la tesi della presenza di interattore proteico capace di mediare l'interazione di proteine ad ancora GPI e stabilizzarle in rafts lipidici, prima della loro incorporazione in vescicole di smistamento apicale (vedi risultati 2 e 3).

Per individuare un'eventuale interattore proteico nei “clusters” di proteine apicali ad

ancora GPI, ho iniziato ad effettuare la proteomica degli oligomeri formati dalla proteina PLAP in cellule epiteliali quali le cellule FRT. Il mio lavoro si è concentrato sull'ottimizzazione di un metodo che permettesse di purificare proteine in quantità relativamente abbondante eliminando nello stesso tempo al massimo contaminanti proteici derivanti dalle metodiche di purificazione che potrebbero interferire con l'analisi spettrometrica rendendo difficile la visualizzazione nello spettro di massa di segnali specifici.

Le analisi condotte finora sono tuttavia preliminari e ci hanno permesso di identificare in maniera chiara almeno 10 proteine presenti esclusivamente negli oligomeri formati dalla proteina apicale.

Di particolare interesse sembrano essere la miosina 1b, coinvolta nel traffico vescicolare e nella migrazione cellulare (Ruppert *et al.*, 1993), la Rap1b, piccola GTPase che ha un ruolo di shuttle tra la membrana plasmatica e il citosol (Nice *et al.*, 1992) e la Tho4, che può funzionare come struttura che media l'interazione tra le proteine e/o l'RNA (Perez-Alvarado *et al.*, 2003). Ancora Lin-7C è coinvolta nello stabilire la distribuzione asimmetrica delle proteine in cellule polarizzate, soprattutto nella via basolaterale (Olsen *et al.*, 2007), la junction plakoglobin ha un ruolo nell'adesione cellula-cellula (Hu *et al.*, 2006) e il distroglicano è richiesto per la polarizzazione di cellule epiteliali (Deng *et al.*, 2003).

Tuttavia questi dati devono essere confermati e resta da verificare un reale coinvolgimento di queste proteine nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale di PLAP. A questo scopo ci proponiamo di effettuare esperimenti di RNA interference per le proteine maggiormente interessanti e vedere eventuali conseguenze dell'assenza di queste proteine nel traffico intracellulare di cellule polarizzate. Resta poi da chiarire come e per mezzo di quali intermediari queste proteine possano interagire con le proteine ad ancora GPI.

MATERIALI E METODI

MATERIALI E METODI

Reagenti ed anticorpi

L'anticorpo anti-PLAP policlonale è stato acquistato da Rockland (Gilbertsville, PA), gli anticorpi anti-p75 e anti-PrP SAF32 sono stati gentilmente forniti rispettivamente dal Dr. André Le Bivic (Faculté des Sciences de Luminy, Marseille, France) e dal Dr. J. Grassi (CEA, Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Gif-sur-Yvette, France). Gli anticorpi secondari coniugati a TRITC (rodamina tretametilata) sono stati acquistati da Jackson.

I reagenti per le colture cellulari sono stati acquistati da Pierce (Rockford, IL), mentre la streptavidina coniugata a HRP da GE Healthcare. Metil- β -cyclodextrin (M- β -CD), mevinolin, mevalonato e tutti agli altri reagenti sono stati acquistati da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Colture cellulari

Le cellule utilizzate per gli esperimenti sono le cellule FRT, una linea cellulare epiteliale polarizzata derivata da tiroide di ratto Fischer e le cellule MDCK, una linea cellulare epiteliale polarizzata derivata da rene di cane Madin-Darby.

Le cellule FRT e MDCK sono state coltivate in piastre di Petri di plastica (Falcon) di 100 mm di diametro, mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 95% di aria e il 5% di CO₂. Il terreno di coltura utilizzato è Ham F12 modificato da Coon per le cellule FRT e il DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) per le cellule MDCK. Entrambi mezzi contengono il 5% di siero fetale bovino (FBS). La sostituzione del mezzo di coltura è stata effettuata ogni 2 giorni. Le cellule sono state osservate durante la loro crescita al

microscopio a contrasto di fase; raggiunto uno stato di confluenza sono state staccate dalla piastra, a cui aderiscono naturalmente, mediante l'uso di una soluzione di tripsina 0.3%, glucosio 0,1%, EGTA 2 mM in PBS pH 7.3 (KCl 13,7 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, NaCl 137 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,06 mM) e passate in nuove piastre alla concentrazione desiderata.

Crescita di cellule su filtro

Allo scopo di valutare la distribuzione polarizzata di proteine sulla membrana plasmatica, le cellule sono state cresciute su filtri di policarbonato con pori di 0,4 micron (Transwell Costar) di diversa dimensione (24 mm, 12 mm, 6 mm) a secondo dell'esperimento. I filtri sono sistemi bicamerali che permettono di accedere separatamente alla superficie apicale e a quella basolaterale delle cellule (Fig. 18). Il filtro, su cui le cellule crescono, è montato su un telaio di plastica che lo tiene sollevato dal fondo della piastra creando due compartimenti separati. Il mezzo di coltura viene aggiunto ad entrambi i compartimenti del sistema. Le cellule, piastrate su filtro in numero di $1,8 \times 10^6$, acquisiscono un buon livello di polarità dopo circa 4 giorni, cioè quando i valori della resistenza transepiteliale raggiungono il valore di plateau. Solo quando raggiungono questo stadio vengono utilizzate per l'esperimento. Il mezzo di coltura é sostituito con mezzo fresco ogni due giorni sia dall'apice (2 ml) sia dalla base (2 ml). Avendo accesso indipendente alle due superfici é stato possibile determinare le differenze di composizione dei due domini plasmatici.

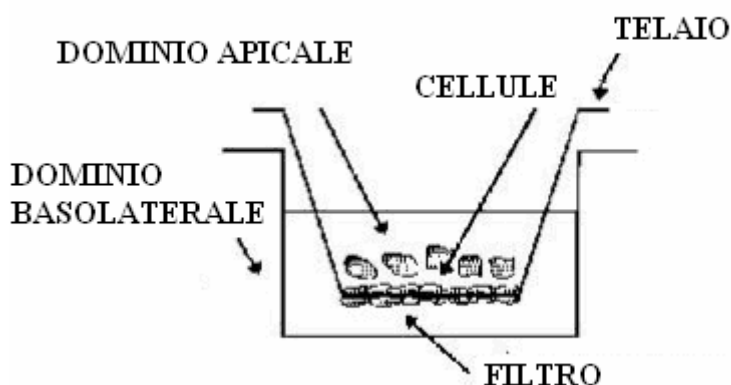


FIG. 18. Sezione schematica di un sistema bicamerale.

Il sistema bicamerale è costituito da un filtro di policarbonato sul quale è possibile coltivare le cellule. Il filtro è montato su un telaio che, appoggiato ai bordi della piastra, lo mantiene staccato dal fondo. Attraverso le fessure presenti sul telaio è possibile accedere al compartimento sottostante il filtro (basolaterale), mentre il compartimento superiore (apicale) è accessibile dall'alto.

Costrutti e trasfezione

I costrutti di p75GPI e di PLAP sono stati costruiti nel vettore di espressione eucariotico pcB6, come anche PLAP ΔN . I costrutti dei mutanti di glicosilazione di p75GPI e di PrP^c sono stati costruiti nel vettore pcDNA 3 minus (-). Tutti i mutanti di glicosilazione sono stati ottenuti utilizzando la tecnica della mutagenesi sito-specifica realizzata con il kit QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene), tranne p75 $\Delta OGPI$ che è stato ottenuto unendo in frame l'ectodominio mancante dello stalk *O*-glicosilato di p75^{NTR} con il segnale di attacco dell'ancora di PLAP.

I costrutti sono stati trasfettati con la metodica del calcio-fosfato (Zurzolo *et al.*, 1993). I cloni stabili sono stati selezionati per la resistenza a G418 (500 μ g/ml) e isolati mediante cilindretti

metallici.

Immunofluorescenza

Le cellule sono state cresciute su vetrino per 2-3 giorni o su filtro di policarbonato per 4 giorni, lavate con PBS Ca/Mg, fissate con una soluzione di paraformaldeide al 2% in PBS Ca/Mg e neutralizzate con 50 mM NH₄Cl. Laddove richiesto dall'esperimento le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di 0,2% gelatina e 0,075% di saponina in PBS Ca/Mg. Le cellule sono state incubate prima con un anticorpo primario specifico per visualizzare l'antigene di interesse e, poi, con un anticorpo secondario coniugato a rodamina sciogliendo gli anticorpi in una soluzione di PBS-gelatina per ridurre i legami aspecifici. Le immagini sono state acquisite usando un microscopio confocale Zeiss Laser Scanning Confocal Microscope (LSM 510). Le immagini prese lungo l'asse Z della cellula, andando dall'apice alla base, sono state processate in modo da ottenere una ricostruzione verticale di ogni cellula.

Saggio di biotinilazione

La sulfosuccinammide-6-(biotinammide)-esanoato (NHS-LC-Biotina) (Pierce, Rockford, IL, USA) è un analogo della biotina, una molecola a struttura ciclica che si lega agli aminogruppi primari delle lisine e arginine libere delle proteine. E' stato dimostrato che la membrana e le giunzioni strette sono ad essa impermeabili (Sargiacomo *et al.*, 1989; Zurzolo *et al.*, 1994). Questa molecola, quindi, si lega selettivamente alle proteine di membrana con cui si trova a diretto contatto. Si possono, così, facilmente ottenere estratti cellulari con proteine di membrana marcate con biotina. Se le proteine non sono state marcate con amminoacidi radioattivi, la biotina può essere rilevata perchè viene riconosciuta e legata in maniera

specifica dalla streptavidina coniugata a perossidasi.

Il metodo della biotinilazione applicato a cellule polarizzate coltivate su filtro, come nel nostro caso, permette di marcare selettivamente le proteine residenti in uno specifico dominio della membrana cellulare. In questo modo si può valutare in quale compartimento si localizza una specifica proteina di membrana. Gli esperimenti quindi richiedono l'utilizzo di due filtri per campione in modo da marcare in un caso la superficie apicale e nell'altro quella basolaterale.

La procedura adottata per la biotinilazione di cellule cresciute su filtro richiede la presenza di Ca^{++} per mantenere integre le giunzioni strette e impedire così il passaggio della biotina attraverso il monostrato cellulare; inoltre, reagenti e cellule sono messi su ghiaccio per evitare che la biotina venga endocitata.

La biotina (0.5 mg/ml) è stata aggiunta all'apice o alla base di cellule cresciute su filtro di policarbonato per 4 giorni. Dopo neutralizzazione con 50 mM NH_4Cl , le cellule sono state lisate nel tampone JS (50 mM hepes, 150 mM NaCl, 1% glicerolo, 1% Triton x-100, 1.5 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA). Dopo aver precipitato i nuclei mediante centrifugazione a 10.000 rpm in eppendorf per 20 min, i lisati sono stati immunoprecipitati O/N con un anticorpo specifico per l'antigene d'interesse. I campioni, dopo essere stati separati su SDS-PAGE, sono stati rivelati usando streptavidina coniugata a perossidasi.

Nel caso in cui le cellule sono state marcate con un isotopo radioattivo, dopo immunoprecipitazione con anticorpi specifici, i lisati sono riprecipitati con streptavidina coniugata a beads di agarosio e i campioni vengono, dopo separazione mediante SDS-PAGE, rivelati mediante fluorografia.

Immunoprecipitazione di lisati cellulari

La tecnica dell'immunoprecipitazione permette di isolare da un lisato cellulare una proteina di interesse. Questo è possibile mediante l'uso di una proteina di origine batterica (la proteina A, isolata dallo *Stafilococcus Aureus*) che ha la proprietà di legarsi in maniera specifica alla porzione Fc degli anticorpi policlonali. Si utilizza una proteina A coniugata a palline della resina sefarosio che possono essere precipitate attraverso una breve centrifugazione. Legando alla proteina A-sefarosio l'anticorpo specifico contro la proteina di nostro interesse è possibile isolarla dalle altre proteine presenti nel lisato. Infatti la proteina A sefarosio, precipitando attraverso centrifugazione, trascina con sé gli anticorpi e le proteine legate ad essi. Dopo il processo di immunoprecipitazione (il cui tempo può variare secondo i tipi di anticorpo), i campioni sono stati lavati due volte con lo stesso tampone di lisi e, poi, varie volte con tamponi a forza ionica decrescente. Infine le beads di sefarosio a cui è coniugato il complesso antigene-anticorpo vengono risospese in tampone Laemmli 2X e bollite per 5' per staccare gli immunocomplessi dalla proteina A-sefarosio.

Marcatura Metabolica (pulse-chase)

La tecnica di pulse-chase permette di seguire, nel tempo, il destino metabolico dei precursori delle proteine. In questa tecnica le cellule vengono incubate per breve tempo in un terreno contenente un precursore radioattivo (pulse) e poi sottoposte ad un lavaggio (chase) con un terreno contenente lo stesso precursore non radioattivo. Ogni volta le cellule sono state affamate con un terreno di coltura DMEM privo di cisteina o metionina/cisteina per 1h, sottoposte ad un pulse con DMEM contenente 100 $\mu\text{Ci/ml}$ di ^{35}S cys o ^{35}S met-cys (GE Healthcare) e, poi, incubate in terreno di chase costituito da DMEM 5% FBS e metionina o

metionina/cisteina 10X per tempi differenti.

Gradiente di densità di saccarosio

Poiché le proteine in soluzione tendono a sedimentare quando sono sottoposte ad elevate forze centrifughe, superando così la tendenza opposta della diffusione, è possibile separare miscele di proteine per mezzo della centrifugazione. Esistono diverse tecniche di centrifugazione; nel nostro lavoro è stato utilizzato una centrifugazione in gradiente di saccarosio all'equilibrio di densità, che separa le proteine di una miscela in relazione alla loro densità. Infatti, le molecole migreranno lungo il gradiente e si arresteranno solo quando avranno raggiunto quel punto del gradiente corrispondente alla propria densità.

Su gradiente di saccarosio sono state analizzate le frazioni insolubili in TX-100 usando protocolli precedentemente pubblicati (Prinetti *et al.*, 2000; Tivodar *et al.*, 2006). Le cellule, cresciute su piastra di 150 mm di diametro ($20-25 \times 10^6$), giunte a confluenza sono state lavate in PBS contenente CaCl_2 e MgCl_2 , lisate in un tampone contenente 1% TX-100/TNE (10mM Tris buffer, pH 7.5, 150 mM EDTA), screpate e fatte passare attraverso un ago 23g. Il lisato è stato quindi mescolato con un ugual volume di 85% saccarosio e corso su un gradiente di saccarosio discontinuo (5-40%) a 39,000 rpm in un'ultracentrifuga (modello SW41, Beckman Inst., Fullerton, CA). Frazioni di 1 ml sono state raccolte andando dall'alto verso il basso del gradiente e i campioni sono stati rivelati mediante Western Blotting usando anticorpi specifici.

Per valutare la distribuzione di GM1 nel gradiente sono stati depositati su filtro di nitrocellulosa 30 μl di ciascuna frazione e sono stati rivelati usando la coniugazione alla subunità B della tossina colerica (Sigma-Aldrich).

Gradiente di velocità di sedimentazione

I gradienti di velocità sono stati effettuati usando protocolli precedentemente descritti (Scheiffele *et al.*, 1998; Meunier *et al.*, 2002). Cellule cresciute fino a confluenza in piastra da 100 mm sono state lavate in PBS Ca/Mg e lisate per 30 min in 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 0,4% SDS e 0,2% Triton X-100 su ghiaccio. I lisati sono stati passati attraverso un ago 26 GA e, dopo aver precipitato i nuclei, sono stati caricati sulla sommità di un gradiente di glicerolo 20-40%. Dopo centrifugazione a 45,000 rpm per 16 ore nel rotore SW50 in ultracentrifuga Beckman, frazioni di 300 µl sono state raccolte andando dall'alto verso il basso del gradiente. Le proteine sono state poi rivelate mediante Western Blotting usando anticorpi specifici o per fluorografia quando le cellule erano state precedentemente marcate con un isotopo radioattivo.

Permetilazione dei glicani dell'ancora GPI

Le bande di PVDF contenenti le proteine di interesse sono state incubate con HF aq. 50% e mantenute in ghiaccio per 60 ore circa. L'HF aq. è quindi rimosso e le strisce sono state lavate due volte con acqua. Quest'acqua di lavaggio, unita all'HF aq., è stata liofilizzata. I risultanti glicani dell'ancora GPI, rilasciati dalla defosforilazione con HF aq., sono stati dissolti in acqua, lavati con metanolo per assicurarsi la completa rimozione dell'acqua, ridissolti in DMSO e permetilati con methyl iodide. In seguito ad aggiunta di cloroformio/acqua (1:1) i glicani permetilati si ripartiscono nella fase più bassa del cloroformio. Questa frazione è stata lavata varie volte con acqua, seccata all'azoto, dissolta in 80% acetonitrile, 0.1 M acetato di sodio e analizzata mediante spettrometria di massa con ionizzazione a elettrospray in modalità positiva (ES-MS) e spettrometria di massa tandem elettrospray (ES-MS/MS) utilizzando lo

spettrometro di massa ABI Q-STARXL (Fig. 19).

Deamminazione dei lipidi dell'ancora GPI.

Le strisce corrispondenti alle bande di PLAP e PrP sono state ritagliate, insieme ad una striscia controllo priva di proteine. Le bande sono state lavate in metanolo tre volte, poi in cloroformio/metanolo 1:1 v/v tre volte e metanolo tre volte. La deamminazione con acido nitroso dei campioni è stata effettuata ponendo la striscia di PVDF in un eccesso di un ugual volume di 300 mM di acetato di sodio pH 4.0 e di NaNO₂ 1 M preparato al momento a 37°C per 3 ore. Le strisce sono state lavate con acqua tre volte e lasciate seccare all'aria. Il fosfatidilinositolo (PI) rilasciato dalla deamminazione è stato estratto dal blot con cloroformio/metanolo (1:1 v/v) e questa soluzione è stata caricata in speciali punte di vetro ricoperte d'oro per nanospray per l'analisi ES/MS-MS con sistema ABI Q-STARXL

Principio di utilizzo dello spettrometro di massa QSTAR XL.

I vantaggi del sistema QSTAR XL sono la sensibilità, la selettività, la riproducibilità e un'eccellente performance per l'analisi di proteine e peptidi, di metaboliti e di prodotti e contaminanti nella chimica combinatoriale. Lo spettrometro di massa QSTAR XL è un sistema versatile e accoppiabile alla cromatografia liquida (LC/MS) su campioni liquidi per identificare, quantificare ed esaminare composti polari. Il sistema QSTAR XL usa due modalità di spettrometria di massa singola (MS) (basata sul quadrupolo e sul tubo di volo) e due modalità di spettrometria di massa in tandem (MS/MS) (ione prodotto e ione precursore).

La spettrometria di massa singola è usata per analizzare molecole cariche allo scopo di determinare il peso molecolare e la quantità di ione rilevato. Nella modalità basata su quadrupolo (Q₁ MS) QSTAR XL genera informazioni usando la prima sezione

quadrupolo dello strumento (Q_1). L'analizzatore di massa quadrupolare è il componente dello strumento responsabile di convogliare gli ioni del campione in esame al rivelatore, sulla base del loro rapporto massa/carica (m/z). Un analizzatore di massa è in essenza un filtro di massa capace di trasmettere solamente lo ione prescelto. Nella modalità basata sul tubo di volo (TOF MS) lo strumento genera informazioni pulsando gli ioni in un tubo di volo e registrando il loro tempo di arrivo preciso al detector. Ioni con un rapporto massa-carica (m/z) maggiore impiegano più tempo per attraversare il tubo di volo.

Le tecniche di MS/MS sono utilizzate per l'analisi di miscele poiché per ogni componente della miscela possono essere ottenuti caratteristici spettri dello ione prodotto senza interferenze da parte di altri componenti, assumendo che lo ione prodotto abbia un rapporto m/z unico. MS/MS può essere usata per analisi precise monitorando specifici ioni precursore/prodotto mentre il campione viene eluito. Questo tipo di analisi è più specifica che la singola MS la quale riesce a discriminare solo sulla base del rapporto m/z ed è stata quella utilizzata nel mio lavoro per determinare la struttura dell'ancora GPI.

Nella spettrometria di massa in tandem Q_1 seleziona uno ione precursore per frammentarlo in Q_2 (una cella di collisione), generando ioni prodotto che sono rilevati nella sezione del tubo di volo. Ioni prodotto danno informazioni sulla struttura molecolare degli ioni precursori originali.

Il sistema QSTAR XL è capace di identificare ioni precursori che generano uno specifico ione prodotto. Lo strumento usa Q_1 come filtro di massa, mentre la sezione del TOF registra gli spettri dello ione prodotto per ogni ione precursore. In questa modalità lo spettro di massa mostra tutti gli ioni precursori prodotti dallo ione prodotto di interesse.

Il sistema di introduzione del campione in QSTAR XL è deputato all'ingresso del campione e

alla sua conversione in ioni che saranno poi analizzati nella sezione del quadrupolo e del tubo di volo dello strumento. Il sistema di introduzione del campione può avvalersi dei seguenti metodi di ionizzazione: ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI), fotoionizzazione a pressione atmosferica, ionizzazione a pressione atmosferica (API) e ionizzazione a desorbimento laser assistita da matrice (MALDI). Il campione può essere introdotto tramite un sistema di pompa a siringa integrata o di LC, una sorgente ionspray o altre sorgenti API, una sorgente oMALDI 2, un'interfaccia con sistema di vuoto. Qui sono forniti ulteriori dettagli solo sui primi due sistemi che sono quelli utilizzati per le analisi da me condotte.

Il flusso di campione allo stato liquido può essere pompato alla sorgente di ioni attraverso un sistema di cromatografia liquida o attraverso una pompa a siringa, con una velocità di flusso determinata dalle richieste di ingresso, dalle condizioni cromatografiche o dal volume del campione disponibile. Se introdotto mediante LC, il campione può essere iniettato attraverso un iniettore a cappio con una colonna di separazione (LC).

La sorgente IonSpray genera ioni a fase gassosa che sono rappresentativi della composizione molecolare del campione con una frammentazione minimale. Tutte le sorgenti di ioni LC operano a pressione atmosferica per produrre ioni a fase gassosa. Questi ioni a fase gassosa sono sottoposti all'analisi spettrometrica di massa dallo strumento. I campioni che sono introdotti attraverso sonde IonSpray sono nebulizzati attraverso un getto di gas e spruzzate attraverso un sistema ad alto voltaggio che crea uno spray di piccole gocce altamente cariche. Gli ioni evaporano dalla superficie della goccia nella sorgente di ioni attraverso un processo chiamato "ion evaporation". La capacità della sorgente convenzionale di ioni IonSpray è estremamente intensificata dalla sorgente MicroIonSpray che riduce la velocità di flusso

dell'introduzione del campione, permettendo di avere lunghi tempi di analisi per volumi di campioni molto piccoli. La MicroIonSpray è basata sulla tecnologia nanospray sviluppata da Mann e Wilm all'EMBL in Germania (Wilm and Mann, 1996).

La camera per gli ioni a bassa pressione è separata dalla sorgente di ioni a pressione atmosferica da un'interfaccia a sistema di vuoto. Questo sistema permette il trasferimento esclusivamente di ioni dalla sorgente allo spettrometro di massa mentre solventi, campione, contaminanti e l'aria dell'ambiente sono lasciati all'esterno. Ciò è ottenuto grazie all'uso di un "curtain gas", un gas inerte solitamente azoto. Il gas infatti collide con gli ioni del campione creando un'energia collisionale che rompe i clusters di ioni e separa gli ioni del campione dalle molecole di solvente.

Numerosi sono i parametri che possono essere modificati per ottimizzare la ionizzazione del campione, la velocità del flusso di ioni, la risoluzione e la sensibilità dello strumento.

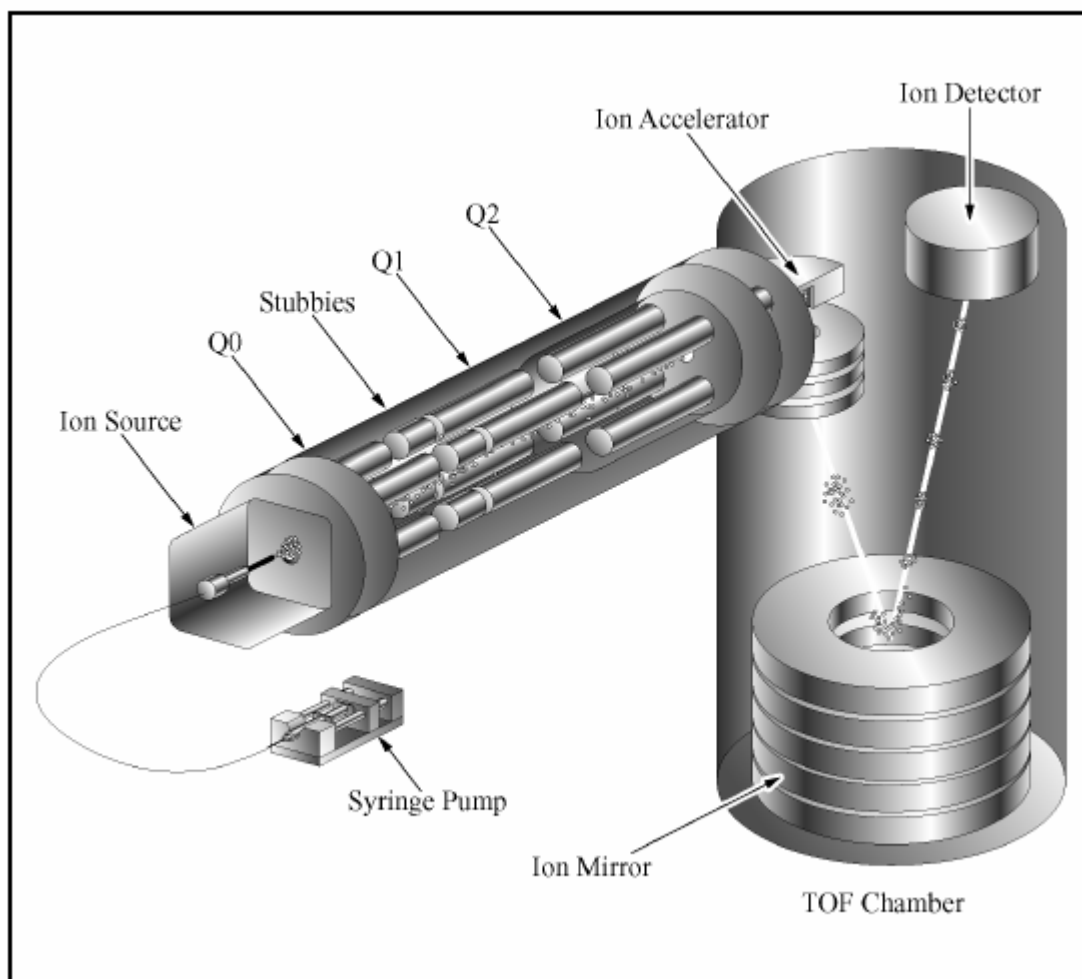


Fig. 19 Schema di uno spettrometro di massa QSTAR XL

Dopo l'introduzione e la ionizzazione del campione gli ioni sono trasferiti dall'interfaccia di vuoto al quadrupolo filtro di massa Q_1 tramite il quadrupolo Q_0 e gli stubbies. Il quadrupolo filtro di massa Q_1 separa gli ioni in base al loro rapporto m/z . Il quadrupolo cella di collisione Q_2 rompe gli ioni precursori negli ioni prodotto attraverso la collisione con molecole di gas neutro. La sezione a tubo di volo (TOF) individua ioni di uno specifico rapporto m/z per generare un segnale che un computer può usare per creare uno spettro di massa.

DISCUSSIONE

DISCUSSIONE

1) Studio del trasporto delle proteine GPI ancorate.

La membrana plasmatica delle cellule epiteliali polarizzate è organizzata in un dominio apicale e in un dominio basolaterale, separati da giunzioni strette. La differente composizione lipidica e proteica dei due domini riflette la specializzazione delle loro funzioni. Questa asimmetria della membrana plasmatica è garantita da uno smistamento continuo di molecole appena sintetizzate e da un meccanismo di internalizzazione regolata (Mellman, 1996; Matter, 2000).

Studi biochimici e di videomicroscopia hanno dimostrato che le proteine apicali e basolaterali segregano in differenti vescicole dopo l'uscita del TGN (Wandinger-Ness *et al.*, 1990; Keller *et al.*, 2001; Kreitzer *et al.*, 2003). Le proteine ad ancora GPI sono indirizzate alla membrana apicale attraverso un meccanismo dipendente da rafts (Arreaza and Brown, 1995; Lipardi *et al.*, 2000) e si suppone che lo smistamento avvenga a livello del TGN (Mayor and Riezman, 2004). Studi di microscopia in cellule *in vivo* hanno mostrato che GPI-APs segregano dalle proteine basolaterali in diverse vescicole nel TGN e da questa sede raggiungono direttamente la superficie apicale (Keller *et al.*, 2001). Tuttavia recentemente è stato proposto che GPI-APs usino una via transcitotica per raggiungere la superficie apicale in cellule MDCK e che, quindi, la segregazione delle proteine avvenga dopo il loro arrivo alla membrana basolaterale (Polishchuk *et al.*, 2004). Questi dati sono in contraddizione con i nostri risultati secondo cui la segregazione e la stabilizzazione in rafts lipidici delle proteine GPI-APs apicali da quelle basolaterali avviene a livello dell'apparato del Golgi (Paladino *et al.*, 2004). Per chiarire quindi la via di trasporto apicale delle proteine ad ancora GPI, in un lavoro al quale ho

collaborato (vedi risultati paragrafo 1), abbiamo analizzato la via seguita da tre differenti GPI-APs per raggiungere la membrana apicale in cellule MDCK utilizzando sia approcci biochimici che di videomicroscopia d'avanguardia in cellule completamente polarizzate su filtro. I dati ottenuti concordano nel dimostrare che sia le proteine appena sintetizzate, sia quelle riciclate, sono direttamente indirizzate dal TGN alla membrana plasmatica senza passare per la membrana basolaterale, suggerendo che la segregazione avvenga intracellularmente. Questi risultati sono rafforzati dall'evidenza che anche in seguito al blocco della fusione delle vescicole con la membrana basolaterale e dell'endocitosi dal polo basolaterale mediante trattamento con acido tannico, lo smistamento apicale non viene perturbato. La differenza tra i nostri risultati e quelli ottenuti da Polishchuck et al. sono verosimilmente legati alle condizioni di coltura e ai metodi utilizzati. Negli esperimenti effettuati da Polishchuck et al. le cellule erano cresciute su filtro solo per 2-3 giorni e quindi non completamente polarizzate. La via transcitotica, infatti, può essere usata da alcune proteine in condizioni di semipolarizzazione cellulare (Zurzolo *et al.*, 1992a). Inoltre le cellule erano state trasfettate in transiente ed erano state utilizzate tecniche di microscopia non sufficientemente sensibili e rapide. Per superare queste difficoltà, in particolare i limiti dovuti ai sistemi di acquisizione di immagini lungo l'asse z dovuti allo spessore delle cellule completamente polarizzate (10-15 microns) e alla rapidità di acquisizione insufficiente, in questo lavoro abbiamo messo a punto una tecnica di videomicroscopia confocale "spinning-disk". Questa tecnica permette di fare della videomicroscopia con tempi di acquisizione molto brevi (dell'ordine di 5 immagini al secondo) senza rovinare il campione anche se l'altezza relativamente grande delle cellule polarizzate e la velocità di acquisizione delle camere dei microscopi limitano la risoluzione delle immagini. I vantaggi derivanti dalla videomicroscopia confocale "spinning-disk" sono stati uniti a quelli derivanti dalla messa a

punto di un sistema di “pulse and chase” della fluorescenza in cellule *in vivo* polarizzate in cui la proteina è bloccata nel TGN attraverso un blocco di temperatura (20°C) e poi rilasciata verso la superficie a 37°C. In questo modo è stato possibile seguire direttamente il segnale fluorescente di GFP-GPI lasciare il TGN e arrivare direttamente alla superficie apicale senza passare per stazioni intermedie.

2) Studio del meccanismo di smistamento apicale delle proteine GPI ancorate.

Se la via seguita dalle proteine GPI-APs per raggiungere la superficie apicale è ormai chiarata, resta ancora da stabilire quali siano i meccanismi che regolano questo trasporto intracellulare. Infatti sebbene putativi segnali di smistamento apicale siano stati trovati negli ectodomini, nel dominio transmembrana e nella coda citosolica di proteine apicali (Yeaman *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998; Rodriguez-Boulán *et al.*, 2005), il meccanismo responsabile dello smistamento apicale delle proteine non è ancora noto. È stato proposto che i rafts lipidici possano agire come una piattaforma per lo smistamento di proteine destinate alla superficie apicale. Questo meccanismo sembra essere particolarmente importante per proteine con un'ancora di glicosilfosfatidilinositolo che favorisce l'associazione ai microdomini lipidici e così il loro smistamento al corretto polo della membrana plasmatica (Brown and Rose, 1992; Simons and Ikonen, 1997). Questa teoria del “lipid-rafts” è stata affinata nel 2004 da Paladino *et al.* dimostrando che affinché GPI-APs siano correttamente smistate alla superficie apicale di cellule epiteliali polarizzate, queste devono associarsi e formare complessi ad alto peso molecolare. La formazione degli oligomeri inizia nel medial Golgi, è concomitante all'associazione delle proteine a rafts ed è dipendente da interazioni proteina-proteina. Impedimenti all'oligomerizzazione portano ad una non corretta distribuzione delle proteina sulla membrana plasmatica (Paladino *et al.*, 2004; Paladino *et al.*,

2006; Paladino *et al.*, 2007). Il meccanismo attraverso cui le GPI-APs possano oligomerizzare non è noto. In particolare non è chiaro da cosa dipenda l'oligomerizzazione e/o quale sia la natura delle interazioni che determinano il “clustering” delle proteine prima del loro smistamento apicale.

Durante il mio lavoro di dottorato ho analizzato tre possibili meccanismi di oligomerizzazione: 1) interazione mediata da zuccheri; 2) interazione mediata dalle ancore di GPI; 3) interazione mediata da un putativo interattore proteico presente nei rafts.

a) Ruolo degli zuccheri.

Il possibile ruolo degli zuccheri nell'oligomerizzazione e nello smistamento apicale delle proteine GPI ancorate prende piede dall'osservazione che la glicosilazione dell'ectodominio proteico ha un ruolo importante nel ripiegamento delle proteine e nella loro aggregazione (Hurtley and Helenius, 1989) e che sia la *N*- che la *O*-glicosilazione sono state implicate nello smistamento apicale di proteine di membrana (Rodriguez-Boulan and Gonzalez, 1999). Perturbazioni della *O*- e /o *N*- glicosilazione, infatti, portano ad uno smistamento non polarizzato di varie proteine di membrana (Kitagawa *et al.*, 1994; Yeaman *et al.*, 1997; Jacob *et al.*, 2000; Martinez-Maza *et al.*, 2001; Pang *et al.*, 2004). Il “sorting” di altre proteine, invece, non è modificato dall'assenza della glicosilazione (Marzolo *et al.*, 1997; Larsen *et al.*, 1999; Meerson *et al.*, 2000; Potter *et al.*, 2004). Per chiarire il ruolo degli zuccheri, quindi, ho analizzato le proprietà di due proteine GPI native, una *N*- e una *O*-glicosilata e dei loro mutanti di glicosilazione (vedi risultati paragrafo 2).

Abbiamo trovato che gli zuccheri non svolgono un ruolo diretto nel determinare il corretto smistamento delle proteine alla membrana apicale in cellule polarizzate, la loro capacità

di associarsi a rafts e la loro abilità ad aggregarsi in complessi ad alto peso molecolare. Solo quando le cellule sono cresciute in presenza di un inibitore della *N*- glicosilazione e in condizioni di deplezione di colesterolo, PLAP è smistata in maniera non polarizzata e non é più capace di oligomerizzare.

I dati ottenuti dalle mie analisi mi hanno portato a proporre un modello alternativo per spiegare l'incorporazione di GPI-APs in vescicole apicali in grado di riconciliare i due modelli precedentemente proposti per descrivere il meccanismo per cui i glicani possono guidare la segregazione delle proteine in vescicole apicali (Rodriguez-Boulant and Gonzalez, 1999). Nel primo modello le proteine sono smistate apicalmente grazie ad una famiglia di recettori che possono riconoscere direttamente gli *N*- e *O*-glicani. Nel secondo modello gli zuccheri hanno un ruolo nel facilitare lo smistamento apicale stabilizzando una conformazione proteica richiesta per l'uscita dal TGN. Dall'analisi dei miei risultati, invece, sembrerebbe che la *N*-glicosilazione dell'ectodominio proteico abbia un ruolo importante nello stabilizzare la conformazione proteica delle proteine. Tuttavia è piuttosto la glicosilazione di un putativo interattore presente nei rafts lipidici ad essere necessario per il riconoscimento e l'oligomerizzazione delle GPI-APs che porta alla loro inclusione in vescicole apicali.

b) Ruolo dell'ancora GPI.

A conferma dell'ipotesi di un putativo interattore proteico capace di mediare l'oligomerizzazione e lo smistamento apicale di GPI-APs, sono anche i dati derivanti dall'analisi strutturale di ancore GPI di proteine smistate alla superficie apicale e basolaterale di cellule epiteliali polarizzate (vedi risultati paragrafo 3).

Durante il mio dottorato ho infatti analizzato la possibilità che l'ancora GPI, oltre a garantire l'inserzione delle proteine a cui è legata nei microdomini lipidici, possa promuoverne anche l'aggregazione in complessi ad alto peso molecolare e quindi il loro smistamento al polo apicale piuttosto che a quello basolaterale avvalendosi di specifiche eterogeneità strutturali dell'ancora stessa. A questo scopo ho analizzato, mediante tecniche di spettrometria di massa, la struttura molecolare dell'ancora GPI di PLAP (proteina apicale) e PrP^c (proteina basolaterale) in cellule FRT e MDCK. Entrambe le proteine sono raft-associate, ma solo PLAP può essere trovata in strutture oligomeriche. Da queste analisi è emerso che in entrambe le linee cellulari l'ancora di PLAP non presenta differenze significative dall'ancora di PrP^c, sia per la porzione lipidica degli acidi grassi del fosfatidilinositolo, sia per la porzione zuccherina. Grazie alla messa a punto per la prima volta di una metodologia abbastanza sensibile da permettere di analizzare proteine come quelle di membrana presenti in basso numero di copie nella cellula, sono riuscita ad ottenere la prima determinazione completa delle ancore GPI di PLAP e PrP^c purificate da cellule FRT e MDCK. In questo lavoro la combinazione del potere risolutivo della SDS-PAGE, della permetilazione e della formazione del catione ammonio quaternario e l'uso del sistema QSTAR XL hanno permesso di sviluppare una tecnica altamente sensibile che permette l'analisi strutturale anche di molecole presenti in basse quantità. Tuttavia questa tecnica non permette di avere informazioni circa residui fosfato attaccati ai glicani dell'ancora. Nel lievito la fosfoetanolamina presente sul Man2 è importante per il corretto smistamento di proteine ad ancora GPI nelle cellule figlie dopo la citochinesi (Shishioh *et al.*, 2005). Ciò indicherebbe un possibile ruolo di questo sostituito fosfato nel trasporto intracellulare di proteine GPI in cellule di mammifero. Prima di escludere definitivamente che una differenza strutturale dell'ancora GPI possa essere responsabile di un differente smistamento delle proteine alla membrana plasmatica, è

necessario quindi analizzare anche eventuali fosfoetanolammine presenti sui glicani delle ancore.

c) Ricerca di un putativo interattore proteico.

Questi dati escludono un coinvolgimento della struttura dell'ancora nel determinare lo smistamento apicale o basolaterale delle proteine GPI ancorate e suggeriscono che un recettore *N*-glicosilato possa essere responsabile del “sorting” e del “clustering” di due proteine modello native glicosilate e GPI ancorate. Nell'ultima parte del mio dottorato, quindi, ho messo a punto una metodica per identificare un putativo interattore proteico capace di mediare l'interazione tra GPI-APs apicali, portando alla loro inclusione in vescicole apicali. Potenziali recettori implicati nello smistamento apicale erano già stati individuati. La proteina integrale vescicolare (VIP36), appartenente alla famiglia delle lectine, è stata la prima ad essere implicata nello smistamento apicale (Fiedler and Simons, 1996). Tuttavia il suo ruolo come recettore apicale è stato messo in discussione da studi che dimostrano il coinvolgimento di questa proteina nel traffico dall'ER al Golgi (Fullekrug *et al.*, 1999; Hara-Kuge *et al.*, 2002). La proteina VIP17/MAL è coinvolta nello smistamento apicale di HA e di altre proteine GPI (Cheong *et al.*, 1999; Puertollano *et al.*, 1999). Inoltre recentemente è stato dimostrato che l'interazione tra la galectina-4 e i sulfatidi è importante nell'organizzazione dei rafts lipidici per un efficiente traffico apicale in cellule HT-29 (Delacour *et al.*, 2005). Tuttavia sono necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo di questi recettori nel mantenimento della polarità cellulare e per una loro identificazione certa. A questo scopo ho sviluppato una metodica, avvalendomi di tecniche di immunoprecipitazione e spettrometria di massa, per realizzare la proteomica dei complessi ad alto peso molecolare formati dalla proteina apicale

PLAP, stabilmente espressa in cellule FRT (vedi risultati paragrafo 4). I risultati preliminari ottenuti finora ci hanno permesso di identificare circa dieci proteine presenti esclusivamente negli oligomeri formati dalla proteina apicale. Tuttavia questi dati devono essere confermati e validati da ulteriori esperimenti.

In definitiva, questo lavoro di tesi porta a proporre un modello in cui le GPI-APs sono segregate in vescicole di smistamento apicali mediante la loro oligomerizzazione stabilizzata dall'ambiente raft-lipidico al quale si associano prima di essere indirizzate alla membrana plasmatica attraverso una via diretta. L'oligomerizzazione delle proteine GPI ancorate apicali sembrerebbe essere mediata da un putativo interattore presente nei rafts lipidici, possibilmente *N*-glicosilato. Ulteriori studi sono necessari per confermare questa ipotesi e per identificare questo interattore proteico.

BIBLIOGRAFIA

- Alfalah, M., Jacob, R., Preuss, U., Zimmer, K.P., Naim, H., and Naim, H.Y. (1999). O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts. *Curr Biol* 9, 593-596.
- Ang, A.L., Taguchi, T., Francis, S., Folsch, H., Murrells, L.J., Pypaert, M., Warren, G., and Mellman, I. (2004). Recycling endosomes can serve as intermediates during transport from the Golgi to the plasma membrane of MDCK cells. *J Cell Biol* 167, 531-543.
- Aroeti, B., and Mostov, K.E. (1994). Polarized sorting of the polymeric immunoglobulin receptor in the exocytotic and endocytotic pathways is controlled by the same amino acids. *Embo J* 13, 2297-2304.
- Arreaza, G., and Brown, D.A. (1995). Sorting and intracellular trafficking of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and two hybrid transmembrane proteins with the same ectodomain in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* 270, 23641-23647.
- Baldwin, M.A. (2005). Analysis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors: the prion protein. *Methods Enzymol* 405, 172-187.
- Benting, J., Rietveld, A., Ansorge, I., and Simons, K. (1999a). Acyl and alkyl chain length of GPI-anchors is critical for raft association in vitro. *FEBS Lett* 462, 47-50.
- Benting, J.H., Rietveld, A.G., and Simons, K. (1999b). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 146, 313-320.
- Bilder, D., Schober, M., and Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* 5, 53-58.
- Birnbaumer, M., Seibold, A., Gilbert, S., Ishido, M., Barberis, C., Antaramian, A., Brabet, P., and Rosenthal, W. (1992). Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. *Nature* 357, 333-335.
- Bonifacino, J.S., and Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 409-414.
- Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D., Cohen-Gould, L., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). Apical sorting of influenza hemagglutinin by transcytosis in retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* 110 (Pt 15), 1717-1727.
- Boucher, D., Cournoyer, D., Stanners, C.P., and Fuks, A. (1989). Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res* 49, 847-852.
- Breuza, L., Fransen, J., and Le Bivic, A. (2000). Transport and function of syntaxin 3 in human epithelial intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1239-1248.
- Brewer, C.B., and Roth, M.G. (1991). A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 114, 413-421.
- Brown, D.A. (1992). Interactions between GPI-anchored proteins and membrane lipids.

Trends Cell Biol 2, 338-343.

Brown, D.A., Crise, B., and Rose, J.K. (1989). Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245, 1499-1501.

Brown, D.A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 111-136.

Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.

Brul, S., King, A., van der Vaart, J.M., Chapman, J., Klis, F., and Verrips, C.T. (1997). The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 229-237.

Cardoso de Almeida, M.L., and Turner, M.J. (1983). The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 302, 349-352.

Casanova, J.E., Apodaca, G., and Mostov, K.E. (1991a). An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* 66, 65-75.

Casanova, J.E., Breitfeld, P.P., Ross, S.A., and Mostov, K.E. (1990). Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science* 248, 742-745.

Casanova, J.E., Mishumi, Y., Ikehara, Y., Hubbard, A.L., and Mostov, K.E. (1991b). Direct apical sorting of rat liver dipeptidylpeptidase IV expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 266, 24428-24432.

Cereijido, M., Robbins, E.S., Dolan, W.J., Rotunno, C.A., and Sabatini, D.D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* 77, 853-880.

Chambard, M., Mauchamp, J., and Chabaud, O. (1987). Synthesis and apical and basolateral secretion of thyroglobulin by thyroid cell monolayers on permeable substrate: modulation by thyrotropin. *J Cell Physiol* 133, 37-45.

Chatterjee, S., and Mayor, S. (2001). The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* 58, 1969-1987.

Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 98-106.

Cheong, K.H., Zacchetti, D., Schneeberger, E.E., and Simons, K. (1999). VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6241-6248.

Chuang, J.Z., and Sung, C.H. (1998). The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 142, 1245-1256.

Corvera, S., Chawla, A., Chakrabarti, R., Joly, M., Buxton, J., and Czech, M.P. (1994). A double leucine within the GLUT4 glucose transporter COOH-terminal domain functions as an endocytosis signal. *J Cell Biol* 126, 1625.

Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y., and Jacob, R. (2006). Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* 16, 408-414.

Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., Andre, S., Le Bivic, A., Gabius, H.J., Manninen, A., Simons, K., and Huet, G. (2005). Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* 169, 491-501.

Deng, W.M., Schneider, M., Frock, R., Castillejo-Lopez, C., Gaman, E.A., Baumgartner, S., and Ruohola-Baker, H. (2003). Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*. *Development* 130, 173-184.

Doering, T.L., Masterson, W.J., Englund, P.T., and Hart, G.W. (1989). Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J Biol Chem* 264, 11168-11173.

Drubin, D.G., and Nelson, W.J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* 84, 335-344.

Durrbach, A., Raposo, G., Tenza, D., Louvard, D., and Coudrier, E. (2000). Truncated brush border myosin I affects membrane traffic in polarized epithelial cells. *Traffic* 1, 411-424.

Eisenhaber, B., Bork, P., and Eisenhaber, F. (1998). Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng* 11, 1155-1161.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.

Ferguson, M.A. (1999). The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112 (Pt 17), 2799-2809.

Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A., and Rademacher, T.W. (1988). Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* 239, 753-759.

Ferguson, M.A., and Williams, A.F. (1988). Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* 57, 285-320.

Fiedler, K., and Simons, K. (1994). A putative novel class of animal lectins in the secretory pathway homologous to leguminous lectins. *Cell* 77, 625-626.

Fiedler, K., and Simons, K. (1995). The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* 81, 309-312.

Fiedler, K., and Simons, K. (1996). Characterization of VIP36, an animal lectin homologous to leguminous lectins. *J Cell Sci* 109 (Pt 1), 271-276.

Friedrichson, T., and Kurzchalia, T.V. (1998). Microdomains of GPI-anchored proteins in living cells revealed by crosslinking. *Nature* 394, 802-805.

Fullekrug, J., Scheiffele, P., and Simons, K. (1999). VIP36 localisation to the early secretory pathway. *J Cell Sci* 112 (Pt 17), 2813-2821.

Galeotti, G. (1904). Concerning the EMF which is generated at the surface of animal membranes on contact with different electrolytes. *Z Physic Chem* 49, 542-552.

Galeotti, G. (1907). Ricerche di elettrofisiologia secondo I criteri dell'elettrochimica. *Z Allg Physiol* 6, 99-108.

Galli, T., Zahraoui, A., Vaidyanathan, V.V., Raposo, G., Tian, J.M., Karin, M., Nimmann,

- H., and Louvard, D. (1998). A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9, 1437-1448.
- Garbi, C., Mascia, A., and Nitsch, L. (1987). Cell polarity and morphogenetic properties of Fischer rat thyroid cells (FRT) cultured in suspension or embedded in different gels. *Cell Mol Biol* 33, 293-305.
- Gouyer, V., Leteurtre, E., Delmotte, P., Steelant, W.F., Krzewinski-Recchi, M.A., Zanetta, J.P., Lesuffleur, T., Trugnan, G., Delannoy, P., and Huet, G. (2001). Differential effect of GalNAc α -O-bn on intracellular trafficking in enterocytic HT-29 and Caco-2 cells: correlation with the glycosyltransferase expression pattern. *J Cell Sci* 114, 1455-1471.
- Green, R.F., Meiss, H.K., and Rodriguez-Boulan, E. (1981). Glycosylation does not determine segregation of viral envelope proteins in the plasma membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 89, 230-239.
- Griffiths, G., and Simons, K. (1986). The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234, 438-443.
- Gut, A., Kappeler, F., Hyka, N., Balda, M.S., Hauri, H.P., and Matter, K. (1998). Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J* 17, 1919-1929.
- Guther, M.L., and Ferguson, M.A. (1995). The role of inositol acylation and inositol deacylation in GPI biosynthesis in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 14, 3080-3093.
- Hara-Kuge, S., Ohkura, T., Ideo, H., Shimada, O., Atsumi, S., and Yamashita, K. (2002). Involvement of VIP36 in intracellular transport and secretion of glycoproteins in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. *J Biol Chem* 277, 16332-16339.
- Harder, T., and Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Current opinion in cell biology* 9, 534-542.
- Helms, J.B., and Zurzolo, C. (2004). Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5, 247-254.
- Holder, A.A. (1983). Carbohydrate is linked through ethanolamine to the C-terminal amino acid of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *Biochem J* 209, 261-262.
- Homans, S.W., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Anand, R., and Williams, A.F. (1988). Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein. *Nature* 333, 269-272.
- Hu, P., Berkowitz, P., Madden, V.J., and Rubenstein, D.S. (2006). Stabilization of plakoglobin and enhanced keratinocyte cell-cell adhesion by intracellular O-glycosylation. *J Biol Chem* 281, 12786-12791.
- Huet, G., Hennebicq-Reig, S., de Bolos, C., Ulloa, F., Lesuffleur, T., Barbat, A., Carriere, V., Kim, I., Real, F.X., Delannoy, P., and Zweibaum, A. (1998). GalNAc- α -O-benzyl inhibits NeuAcalpha2-3 glycosylation and blocks the intracellular transport of apical glycoproteins and mucus in differentiated HT-29 cells. *J Cell Biol* 141, 1311-1322.
- Hunziker, W., Harter, C., Matter, K., and Mellman, I. (1991). Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66, 907-920.

- Hurtley, S.M., and Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 5, 277-307.
- Ihrke, G., Bruns, J.R., Luzio, J.P., and Weisz, O.A. (2001). Competing sorting signals guide endolyn along a novel route to lysosomes in MDCK cells. *EMBO J* 20, 6256-6264.
- Ikezawa, H. (2002). Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biol Pharm Bull* 25, 409-417.
- Ikezawa, H., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyashita, T., and Ohyabu, T. (1976). Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim Biophys Acta* 450, 154-164.
- Inoue, N., Murakami, Y., and Kinoshita, T. (2003). Molecular genetics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 77, 107-112.
- Jacob, R., Alfalah, M., Grunberg, J., Obendorf, M., and Naim, H.Y. (2000). Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein. *J Biol Chem* 275, 6566-6572.
- Jing, S., Wen, D., Yu, Y., Holst, P.L., Luo, Y., Fang, M., Tamir, R., Antonio, L., Hu, Z., Cupples, R., Louis, J.C., Hu, S., Altrock, B.W., and Fox, G.M. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85, 1113-1124.
- Keller, P., Toomre, D., Diaz, E., White, J., and Simons, K. (2001). Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells. *Nat Cell Biol* 3, 140-149.
- Kitagawa, Y., Sano, Y., Ueda, M., Higashio, K., Narita, H., Okano, M., Matsumoto, S., and Sasaki, R. (1994). N-glycosylation of erythropoietin is critical for apical secretion by Madin-Darby canine kidney cells. *Exp Cell Res* 213, 449-457.
- Knust, E., and Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298, 1955-1959.
- Kodukula, K., Maxwell, S.E., and Udenfriend, S. (1995). Processing of nascent proteins to glycosylphosphatidylinositol-anchored forms in cell-free systems. *Methods Enzymol* 250, 536-547.
- Kreitzer, G., Marmorstein, A., Okamoto, P., Vallee, R., and Rodriguez-Boulan, E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* 2, 125-127.
- Kreitzer, G., Schmoranzer, J., Low, S.H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., Simon, S.M., and Rodriguez-Boulan, E. (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat Cell Biol* 5, 126-136.
- Kroschewski, R., Hall, A., and Mellman, I. (1999). Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* 1, 8-13.
- Kurzchalia, T.V., and Parton, R.G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 11, 424-431.
- Lafont, F., Verkade, P., Galli, T., Wimmer, C., Louvard, D., and Simons, K. (1999). Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney

cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3734-3738.

Larsen, J.E., Avvakumov, G.V., Hammond, G.L., and Vogel, L.K. (1999). N-glycans are not the signal for apical sorting of corticosteroid binding globulin in MDCK cells. *FEBS Lett* 451, 19-22.

Le Bivic, A., Sambuy, Y., Patzak, A., Patil, N., Chao, M., and Rodriguez-Boulau, E. (1991). An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J Cell Biol* 115, 607-618.

Leidich, S.D., Drapp, D.A., and Orlean, P. (1994). A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem* 269, 10193-10196.

Lin, S., Naim, H.Y., Rodriguez, A.C., and Roth, M.G. (1998). Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol* 142, 51-57.

Lipardi, C., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (1999). Mechanisms of apical protein sorting in polarized thyroid epithelial cells. *Biochimie* 81, 347-353.

Lipardi, C., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (2000). Detergent-insoluble GPI-anchored proteins are apically sorted in fischer rat thyroid cells, but interference with cholesterol or sphingolipids differentially affects detergent insolubility and apical sorting. *Mol Biol Cell* 11, 531-542.

Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A., and Rodriguez-Boulau, E. (1989a). A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 109, 2145-2156.

Lisanti, M.P., Field, M.C., Caras, I.W., Menon, A.K., and Rodriguez-Boulau, E. (1991). Mannosamine, a novel inhibitor of glycosylphosphatidylinositol incorporation into proteins. *EMBO J* 10, 1969-1977.

Lisanti, M.P., Le Bivic, A., Sargiacomo, M., and Rodriguez-Boulau, E. (1989b). Steady-state distribution and biogenesis of endogenous Madin-Darby canine kidney glycoproteins: evidence for intracellular sorting and polarized cell surface delivery. *J Cell Biol* 109, 2117-2127.

Lisanti, M.P., and Rodriguez-Boulau, E. (1990). Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem Sci* 15, 113-118.

Lisanti, M.P., Rodriguez-Boulau, E., and Saltiel, A.R. (1990). Emerging functional roles for the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchor. *J Membr Biol* 117, 1-10.

Lisanti, M.P., Sargiacomo, M., Graeve, L., Saltiel, A.R., and Rodriguez-Boulau, E. (1988). Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9557-9561.

London, E., and Brown, D.A. (2000). Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). *Biochim Biophys Acta* 1508, 182-195.

Low, M.G., and Finean, J.B. (1977). Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem J* 167, 281-284.

- Low, M.G., and Finean, J.B. (1978). Specific release of plasma membrane enzymes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochim Biophys Acta* 508, 565-570.
- Low, M.G., and Zilversmit, D.B. (1980). Role of phosphatidylinositol in attachment of alkaline phosphatase to membranes. *Biochemistry* 19, 3913-3918.
- Low, S.H., Chapin, S.J., Weimbs, T., Komuves, L.G., Bennett, M.K., and Mostov, K.E. (1996). Differential localization of syntaxin isoforms in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 7, 2007-2018.
- Low, S.H., Chapin, S.J., Wimmer, C., Whiteheart, S.W., Komuves, L.G., Mostov, K.E., and Weimbs, T. (1998). The SNARE machinery is involved in apical plasma membrane trafficking in MDCK cells. *J Cell Biol* 141, 1503-1513.
- Mann, R.K., and Beachy, P.A. (2000). Cholesterol modification of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1529, 188-202.
- Martin, K.C., and Kandel, E.R. (1996). Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* 17, 567-570.
- Martinez-Maza, R., Poyatos, I., Lopez-Corcuera, B., E, N.u., Gimenez, C., Zafra, F., and Aragon, C. (2001). The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 276, 2168-2173.
- Marzolo, M.P., Bull, P., and Gonzalez, A. (1997). Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HBsAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1834-1839.
- Matlin, K.S., and Simons, K. (1984). Sorting of an apical plasma membrane glycoprotein occurs before it reaches the cell surface in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 99, 2131-2139.
- Matter, K. (2000). Epithelial polarity: sorting out the sorters. *Curr Biol* 10, R39-42.
- Matter, K., and Mellman, I. (1994). Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 6, 545-554.
- Matter, K., Whitney, J.A., Yamamoto, E.M., and Mellman, I. (1993). Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* 74, 1053-1064.
- Mauchamp, J., Chambard, M., Verrier, B., Gabrion, J., Chabaud, O., Gerard, C., Penel, C., Pialat, B., and Anfosso, F. (1987). Epithelial cell polarization in culture: orientation of cell polarity and expression of specific functions, studied with cultured thyroid cells. *J Cell Sci Suppl* 8, 345-358.
- Mayor, S., and Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 110-120.
- McGwire, G.B., Becker, R.P., and Skidgel, R.A. (1999). Carboxypeptidase M, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, is localized on both the apical and basolateral domains of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 274, 31632-31640.
- Meerson, N.R., Bello, V., Delaunay, J.L., Slimane, T.A., Delautier, D., Lenoir, C., Trugnan, G., and Maurice, M. (2000). Intracellular traffic of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase NPP3 to the apical plasma membrane of MDCK and Caco-2 cells: apical targeting occurs in the absence of N-glycosylation. *J Cell Sci* 113 Pt 23,

4193-4202.

Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 575-625.

Menon, A.K., Mayor, S., and Schwarz, R.T. (1990). Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol lipids in *Trypanosoma brucei*: involvement of mannosylphosphoryldolichol as the mannose donor. *EMBO J* 9, 4249-4258.

Meunier, L., Usherwood, Y.K., Chung, K.T., and Hendershot, L.M. (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 13, 4456-4469.

Milne, K.G., Ferguson, M.A., and Masterson, W.J. (1992). Inhibition of the GlcNAc transferase of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in African trypanosomes. *Eur J Biochem* 208, 309-314.

Milne, K.G., Field, R.A., Masterson, W.J., Cottaz, S., Brimacombe, J.S., and Ferguson, M.A. (1994). Partial purification and characterization of the N-acetylglucosaminylphosphatidylinositol de-N-acetylase of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in African trypanosomes. *J Biol Chem* 269, 16403-16408.

Misek, D.E., Bard, E., and Rodriguez-Boulant, E. (1984). Biogenesis of epithelial cell polarity: intracellular sorting and vectorial exocytosis of an apical plasma membrane glycoprotein. *Cell* 39, 537-546.

Misfeldt, D.S., Hamamoto, S.T., and Pitelka, D.R. (1976). Transepithelial transport in cell culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1212-1216.

Mostov, K.E. (2003). Epithelial polarity and morphogenesis. *Methods* 30, 189-190.

Mostov, K.E., de Bruyn Kops, A., and Deitcher, D.L. (1986). Deletion of the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor prevents basolateral localization and endocytosis. *Cell* 47, 359-364.

Mostov, K.E., Verges, M., and Altschuler, Y. (2000). Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* 12, 483-490.

Moyer, B.D., Denton, J., Karlson, K.H., Reynolds, D., Wang, S., Mickle, J.E., Milewski, M., Cutting, G.R., Guggino, W.B., Li, M., and Stanton, B.A. (1999). A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 104, 1353-1361.

Moyer, B.D., Duhaime, M., Shaw, C., Denton, J., Reynolds, D., Karlson, K.H., Pfeiffer, J., Wang, S., Mickle, J.E., Milewski, M., Cutting, G.R., Guggino, W.B., Li, M., and Stanton, B.A. (2000). The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J Biol Chem* 275, 27069-27074.

Myat, M.M., and Andrew, D.J. (2002). Epithelial tube morphology is determined by the polarized growth and delivery of apical membrane. *Cell* 111, 879-891.

Naim, H.Y., Joberty, G., Alfalah, M., and Jacob, R. (1999). Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 274, 17961-17967.

Nice, E.C., Fabri, L., Hammacher, A., Holden, J., Simpson, R.J., and Burgess, A.W. (1992).

The purification of a Rap1 GTPase-activating protein from bovine brain cytosol. *J Biol Chem* 267, 1546-1553.

Nieva, J.L., Bron, R., Corver, J., and Wilschut, J. (1994). Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *EMBO J* 13, 2797-2804.

Nitsch, L., and Wollman, S.H. (1980a). Suspension culture of separated follicles consisting of differentiated thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 472-476.

Nitsch, L., and Wollman, S.H. (1980b). Ultrastructure of intermediate stages in polarity reversal of thyroid epithelium in follicles in suspension culture. *J Cell Biol* 86, 875-880.

Noda, Y., Okada, Y., Saito, N., Setou, M., Xu, Y., Zhang, Z., and Hirokawa, N. (2001). KIFC3, a microtubule minus end-directed motor for the apical transport of annexin XIIIb-associated Triton-insoluble membranes. *J Cell Biol* 155, 77-88.

Olsen, O., Funke, L., Long, J.F., Fukata, M., Kazuta, T., Trinidad, J.C., Moore, K.A., Misawa, H., Welling, P.A., Burlingame, A.L., Zhang, M., and Brecht, D.S. (2007). Renal defects associated with improper polarization of the CRB and DLG polarity complexes in MALS-3 knockout mice. *J Cell Biol* 179, 151-164.

Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.

Paladino, S., Pocard, T., Catino, M.A., and Zurzolo, C. (2006). GPI-anchored proteins are directly targeted to the apical surface in fully polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 172, 1023-1034.

Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 167, 699-709.

Paladino, S., Sarnataro, D., Tivodar, S., and Zurzolo, C. (2007). Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins. *Traffic* 8, 251-258.

Pang, S., Urquhart, P., and Hooper, N.M. (2004). N-glycans, not the GPI anchor, mediate the apical targeting of a naturally glycosylated, GPI-anchored protein in polarised epithelial cells. *J Cell Sci* 117, 5079-5086.

Paturiaux-Hanocq, F., Zitzmann, N., Hanocq-Quertier, J., Vanhamme, L., Rolin, S., Geuskens, M., Ferguson, M.A., and Pays, E. (1997). Expression of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma gambiense* in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* shows that the cell type dictates the nature of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attached to the glycoprotein. *Biochem J* 324 (Pt 3), 885-895.

Perez-Alvarado, G.C., Martinez-Yamout, M., Allen, M.M., Grosschedl, R., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2003). Structure of the nuclear factor ALY: insights into post-transcriptional regulatory and mRNA nuclear export processes. *Biochemistry* 42, 7348-7357.

Pfeffer, S.R. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat Cell Biol* 1, E17-22.

Phalen, T., and Kielian, M. (1991). Cholesterol is required for infection by Semliki Forest virus. *J Cell Biol* 112, 615-623.

- Pocard, T., Le Bivic, A., Galli, T., and Zurzolo, C. (2007). Distinct v-SNAREs regulate direct and indirect apical delivery in polarized epithelial cells. *J Cell Sci* 120, 3309-3320.
- Polishchuk, R., Di Pentima, A., and Lippincott-Schwartz, J. (2004). Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat Cell Biol* 6, 297-307. Epub 2004 Mar 2028.
- Potter, B.A., Ihrke, G., Bruns, J.R., Weixel, K.M., and Weisz, O.A. (2004). Specific N-glycans direct apical delivery of transmembrane, but not soluble or glycosylphosphatidylinositol-anchored forms of endolyn in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 15, 1407-1416.
- Pralle, A., Keller, P., Florin, E.L., Simons, K., and Horber, J.K. (2000). Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 148, 997-1008.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2000). Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem* 275, 11658-11665.
- Proszynski, T.J., Simons, K., and Bagnat, M. (2004). O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* 15, 1533-1543.
- Puertollano, R., Martin-Belmonte, F., Millan, J., de Marco, M.C., Albar, J.P., Kremer, L., and Alonso, M.A. (1999). The MAL proteolipid is necessary for normal apical transport and accurate sorting of the influenza virus hemagglutinin in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 145, 141-151.
- Ramalingam, S., Maxwell, S.E., Medof, M.E., Chen, R., Gerber, L.D., and Udenfriend, S. (1996). COOH-terminal processing of nascent polypeptides by the glycosylphosphatidylinositol transamidase in the presence of hydrazine is governed by the same parameters as glycosylphosphatidylinositol addition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7528-7533.
- Redman, C.A., Thomas-Oates, J.E., Ogata, S., Ikehara, Y., and Ferguson, M.A. (1994). Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. *Biochem J* 302 (Pt 3), 861-865.
- Rietveld, A., and Simons, K. (1998). The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1376, 467-479.
- Rindler, M.J., Ivanov, I.E., Plesken, H., Rodriguez-Boulan, E., and Sabatini, D.D. (1984). Viral glycoproteins destined for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 98, 1304-1319.
- Rindler, M.J., Ivanov, I.E., and Sabatini, D.D. (1987). Microtubule-acting drugs lead to the nonpolarized delivery of the influenza hemagglutinin to the cell surface of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 104, 231-241.
- Roberts, W.L., and Rosenberry, T.L. (1985). Identification of covalently attached fatty acids in the hydrophobic membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 133, 621-627.
- Robinson, P.J. (1991). Phosphatidylinositol membrane anchors and T-cell activation.

Immunol Today 12, 35-41.

Robinson, P.J. (1997). Signal transduction via GPI-anchored membrane proteins. *Adv Exp Med Biol* 419, 365-370.

Rodriguez-Boulau, E. (1978). Asymetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75, 5071-5075.

Rodriguez-Boulau, E. (1980). Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. *Cell* 20, 45-54.

Rodriguez-Boulau, E., and Gonzalez, A. (1999). Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* 9, 291-294.

Rodriguez-Boulau, E., Kreitzer, G., and Musch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 233-247.

Rodriguez-Boulau, E., and Nelson, W.J. (1989). Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245, 718-725.

Rodriguez-Boulau, E., Paskiet, K.T., and Sabatini, D.D. (1983). Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J Cell Biol* 96, 866-874.

Rodriguez-Boulau, E., Paskiet, K.T., Salas, P.J., and Bard, E. (1984). Intracellular transport of influenza virus hemagglutinin to the apical surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 98, 308-319.

Rodriguez-Boulau, E., and Powell, S.K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol* 8, 395-427.

Ruppert, C., Kroschewski, R., and Bahler, M. (1993). Identification, characterization and cloning of myr 1, a mammalian myosin-I. *J Cell Biol* 120, 1393-1403.

Sargiacomo, M., Lisanti, M., Graeve, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulau, E. (1989). Integral and peripheral protein composition of the apical and basolateral membrane domains in MDCK cells. *J Membr Biol* 107, 277-286.

Sarnataro, D., Paladino, S., Campana, V., Grassi, J., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (2002). PrPC is sorted to the basolateral membrane of epithelial cells independently of its association with rafts. *Traffic* 3, 810-821.

Scheiffele, P., Peranen, J., and Simons, K. (1995). N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378, 96-98.

Scheiffele, P., Verkade, P., Fra, A.M., Virta, H., Simons, K., and Ikonen, E. (1998). Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells. *J Cell Biol* 140, 795-806.

Schneider, P., and Ferguson, M.A. (1995). Microscale analysis of glycosylphosphatidylinositol structures. *Methods Enzymol* 250, 614-630.

Schroeder, R.J., Ahmed, S.N., Zhu, Y., London, E., and Brown, D.A. (1998). Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem* 273, 1150-1157.

Schutz, G.J., Sonnleitner, M., Hinterdorfer, P., and Schindler, H. (2000). Single molecule microscopy of biomembranes (review). *Mol Membr Biol* 17, 17-29.

- Screaton, R.A., DeMarte, L., Draber, P., and Stanners, C.P. (2000). The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigen resides in its glycoposphatidylinositol anchor. *J Cell Biol* 150, 613-626.
- Sharma, P., Varma, R., Sarasij, R.C., Ira, Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M., and Mayor, S. (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell* 116, 577-589.
- Sheff, D.R., Kroschewski, R., and Mellman, I. (2002). Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes. *Mol Biol Cell* 13, 262-275.
- Shishioh, N., Hong, Y., Ohishi, K., Ashida, H., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2005). GPI7 is the second partner of PIG-F and involved in modification of glycosylphosphatidylinositol. *J Biol Chem* 280, 9728-9734.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Simons, K., and van Meer, G. (1988). Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27, 6197-6202.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Slimane, T.A., Lenoir, C., Sapin, C., Maurice, M., and Trugnan, G. (2000). Apical secretion and sialylation of soluble dipeptidyl peptidase IV are two related events. *Exp Cell Res* 258, 184-194.
- Spodisberg, N., Alfalah, M., and Naim, H.Y. (2001). Characteristics and structural requirements of apical sorting of the rat growth hormone through the O-glycosylated stalk region of intestinal sucrase-isomaltase. *J Biol Chem* 276, 46597-46604.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Hecker, R., Pan, K.M., Burlingame, A.L., and Prusiner, S.B. (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* 31, 5043-5053.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., and Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.
- Su, T., Cariappa, R., and Stanley, K. (1999). N-glycans are not a universal signal for apical sorting of secretory proteins. *FEBS Lett* 453, 391-394.
- Sun, A.Q., Ananthanarayanan, M., Soroka, C.J., Thevananther, S., Shneider, B.L., and Suchy, F.J. (1998). Sorting of rat liver and ileal sodium-dependent bile acid transporters in polarized epithelial cells. *Am J Physiol* 275, G1045-1055.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Taguchi, R., Asahi, Y., and Ikezawa, H. (1980). Purification and properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Biochim Biophys Acta* 619, 48-57.
- Tai, A.W., Chuang, J.Z., Bode, C., Wolfrum, U., and Sung, C.H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by

binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97, 877-887.

Takeda, J., Miyata, T., Kawagoe, K., Iida, Y., Endo, Y., Fujita, T., Takahashi, M., Kitani, T., and Kinoshita, T. (1993). Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73, 703-711.

Tanentzapf, G., and Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* 5, 46-52.

Thomas, D.C., and Roth, M.G. (1994). The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence but having diverse targeting activities. *J Biol Chem* 269, 15732-15739.

Thomson, L.M., Lamont, D.J., Mehlert, A., Barry, J.D., and Ferguson, M.A. (2002). Partial structure of glutamic acid and alanine-rich protein, a major surface glycoprotein of the insect stages of *Trypanosoma congolense*. *J Biol Chem* 277, 48899-48904.

Tivodar, S., Paladino, S., Pillich, R., Prinetti, A., Chigorno, V., van Meer, G., Sonnino, S., and Zurzolo, C. (2006). Analysis of detergent-resistant membranes associated with apical and basolateral GPI-anchored proteins in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* 580, 5705-5712.

Trischler, M., Koch-Brandt, C., and Ullrich, O. (2001). Apical transport of osteopontin is independent of N-glycosylation and sialylation. *Mol Membr Biol* 18, 275-281.

Udenfriend, S., and Kodukula, K. (1995). How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 64, 563-591.

Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M., and Kondor-Koch, C. (1987). Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *J Cell Biol* 105, 2735-2743.

Ussing, H.H., and Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23, 110-127.

van Meer, G., and Simons, K. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J Cell Biochem* 36, 51-58.

Varma, R., and Mayor, S. (1998). GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature* 394, 798-801.

Wandinger-Ness, A., Bennett, M.K., Antony, C., and Simons, K. (1990). Distinct transport vesicles mediate the delivery of plasma membrane proteins to the apical and basolateral domains of MDCK cells. *J Cell Biol* 111, 987-1000.

Wilm, M., and Mann, M. (1996). Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 68, 1-8.

Yeaman, C., Grindstaff, K.K., Hansen, M.D., and Nelson, W.J. (1999). Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place. *Curr Biol* 9, R515-517.

Yeaman, C., Le Gall, A.H., Baldwin, A.N., Monlauzeur, L., Le Bivic, A., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 929-940.

Zitzmann, N., and Ferguson, M.A. (1999). Analysis of the carbohydrate components of glycosylphosphatidylinositol structures using fluorescent labeling. *Methods Mol Biol* 116, 73-

Zitzmann, N., Mehlert, A., Carrouee, S., Rudd, P.M., and Ferguson, M.A. (2000). Protein structure controls the processing of the N-linked oligosaccharides and glycosylphosphatidylinositol glycans of variant surface glycoproteins expressed in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Glycobiology* 10, 243-249.

Zurzolo, C., Le Bivic, A., Quaroni, A., Nitsch, L., and Rodriguez-Boulan, E. (1992a). Modulation of transcytotic and direct targeting pathways in a polarized thyroid cell line. *EMBO Journal*. 11, 2337-2344.

Zurzolo, C., Lisanti, M.P., Caras, I.W., Nitsch, L., and Rodriguez-Boulan, E. (1993). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer rat thyroid epithelial cells. *J Cell Biol* 121, 1031-1039.

Zurzolo, C., Polistina, C., Saini, M., Gentile, R., Aloj, L., Migliaccio, G., Bonatti, S., and Nitsch, L. (1992b). Opposite polarity of virus budding and of viral envelope glycoprotein distribution in epithelial cells derived from different tissues. *J Cell Biol* 117, 551-564.

Zurzolo, C., and Rodriguez-Boulan, E. (1993). Delivery of Na⁺,K⁺-ATPase in polarized epithelial cells.[comment]. *Science*. 260, 550-552; discussion 554-556.

Zurzolo, C., van't Hof, W., van Meer, G., and Rodriguez-Boulan, E. (1994). VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *Embo J* 13, 42-53.